

LGL

Leitfaden Labordiagnostik
von Shigatoxin-bildenden
und anderen
darmpathogenen
Escherichia coli-Stämmen

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit haben wir auf die gleichzeitige Verwendung geschlechtsspezifischer Schreibformen verzichtet. Sämtliche Personenbezeichnungen gelten gleichermaßen für alle Geschlechter.

Herausgeber: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)
Eggenreuther Weg 43, 91058 Erlangen

Telefon: 09131 6808-0
Telefax: 09131 6808-2102
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de
Internet: www.lgl.bayern.de

Druck: Online-Publikation
Bildnachweis: Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)

Stand: Mai 2019 (2. Auflage – inhaltlich veränderte Version
vom November 2005)

Autoren: Dr. Regina Konrad, Dr. Katharina Schönberger,
Tom Woudenberg

Bei fachlichen Fragen wenden Sie sich bitte an:

Dr. Regina Konrad, Dr. Katharina Schönberger, Dr. Nikolaus Ackermann,
Prof. Dr. Dr. Andreas Sing
Telefon: 09131 6808- 0
E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de

© Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
alle Rechte vorbehalten

ISBN 978-3-96151-058-0 Internetausgabe

Diese Druckschrift wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlwerbern oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Druckschrift nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Druckschrift zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden. Diese Publikation ist urheberrechtlich geschützt, die publizistische Verwertung – auch von Teilen – der Veröffentlichung wird jedoch ausdrücklich begrüßt. Bitte nehmen Sie Kontakt mit dem Herausgeber auf, der Sie wenn möglich mit digitalen Daten der Inhalte und bei der Beschaffung der Wiedergaberechte unterstützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die Broschüre wird kostenlos abgegeben, jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Diese Broschüre wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Für die Inhalte fremder Internetangebote sind wir nicht verantwortlich.



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung. Unter Telefon 089 122220 oder per E-Mail unter direkt@bayern.de erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
2	<i>Escherichia coli</i> als Krankheitserreger	4
2.1	STEC = VTEC = EHEC?	4
2.2	Sonstige darmpathogene <i>E. coli</i> : EPEC, ETEC, EIEC, EAaggEC, DAEC	5
3	Labordiagnostik	6
3.1	Ablauf	6
3.2	Ausgangsmaterial für die Labordiagnostik	6
3.2.1	Stuhlanreicherung/Mischkultur	6
3.2.2	Isolat / Reinkultur	7
3.2.3	Serum (nur bei HUS-Fällen)	7
3.3	Nachweismethoden	8
3.3.1	Proteinnachweis am Beispiel Shigatoxin	8
3.3.2	DNA-Nachweis am Beispiel des Shigatoxin-Gens	9
3.3.3	Serotypisierung	9
3.3.4	Next Generation Sequencing (NGS)	10
3.4	Kommentierung der Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts und Eingabe in die Meldesoftware	11
3.5	Meldung einer klinischen Erkrankung	11
3.6	Meldung eines labordiagnostischen Nachweises	11
3.6.1	EHEC-Erkrankung	11
3.6.2	Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)	12
3.6.3	<i>E. coli</i> Enteritis	13
3.7	Epidemiologische Bestätigung	13
4	Literatur	14
5	Anhang	15
Anhang 1: Schaubild zur Übermittlung von Fallmeldungen für enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i> (EHEC)		15
Anhang 2: Checkliste HUS		16
6	Glossar	18

1 Einleitung

Der labordiagnostische Nachweis einer Infektion mit darmpathogenen *Escherichia coli* ist auf mehreren Wegen möglich. Für die Gesundheitsämter ist aus eingegangenen Labormeldungen nicht immer erkennbar, ob die Meldungen die vom Robert Koch-Institut (RKI) vorgegebenen Falldefinitionen für den labordiagnostischen Nachweis dieser Infektionen erfüllen. Der vorliegende Leitfaden soll die Labordiagnostik von darmpathogenen *E. coli* verständlicher machen und Kriterien bieten, um die Übermittlung dieser Infektionen zu vereinfachen. Dies soll helfen, die Datenqualität der nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) übermittelten Falldaten weiter zu verbessern. Seit der 1. Auflage dieses Leitfadens aus dem Jahr 2005 wurde die Diagnostik stetig weiterentwickelt und verfeinert. Das Gesundheitsamt steht aber vor ähnlichen Herausforderungen wie vor 14 Jahren. Die Neuerungen sollen verständlich dargestellt werden.

2 *Escherichia coli* als Krankheitserreger

Das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) ist Teil der normalen Darmflora von Mensch und Tier und somit primär kein Krankheitserreger. Ein krankmachender (pathogener) *E. coli*-Stamm unterscheidet sich von einem apathogenen Stamm als Bestandteil der normalen Darmflora dadurch, dass Pathogenitätsfaktoren vorliegen. Diese sind krankmachende Bakterienprodukte (z.B. Toxine), die auf Pathogenitätsgenen kodiert sind, die entweder im Bakterien-Chromosom integriert oder auf sog. Plasmiden extrachromosomal in der Bakterienzelle vorliegen. Bei pathogenen *E. coli*-Stämmen sind v.a. Shigatoxine wichtige Pathogenitätsfaktoren. Um labordiagnostisch einen apathogenen von einem pathogenen *E. coli* unterscheiden zu können, ist der Nachweis mindestens eines Pathogenitätsfaktors oder seines Gens notwendig.

2.1 STEC = VTEC = EHEC?

Der Begriff **VTEC** (Verotoxinbildende *E. coli*) stammt aus der Zeit, als der labordiagnostische Nachweis ausschließlich in Zellkultur mit sog. Verozellen (Nierenzellen von Grünen Meerkatzen) durchgeführt wurde. Wenn die Zellen abstarben, war ein Giftstoff (Toxin) vorhanden, der toxisch auf diese Zellen wirkte, das sog. Verotoxin. Später wurde dieses Verotoxin als Shigatoxin bezeichnet, weil das Shigatoxin 1 identisch mit dem Toxin von *Shigella dysenteriae* ist. Das Shigatoxin 2 hat ebenfalls Ähnlichkeiten mit diesem Toxin. Davon abgeleitet werden VTEC synonym auch als **STEC** (Shigatoxin-bildende *E. coli*) bezeichnet.

Die Unterscheidung zwischen Shigatoxin-bildenden und enterohämorrhagischen *E. coli* (STEC bzw. EHEC) ist schwierig. Sie beruht auf der Beobachtung, dass nicht

alle *E. coli*-Keime, die Shigatoxine bilden, auch zu schwerwiegenden Erkrankungen beim Menschen führen.

EHEC im engeren Sinne sind daher STEC mit weiteren Pathogenitätsfaktoren neben dem Shigatoxin, die beim Menschen eine hämorrhagische Colitis mit den typischen Symptomen wie blutige Durchfälle, Fieber, Übelkeit etc. auslösen.

Im Folgenden wird der Begriff EHEC, entsprechend dem Infektionsschutzgesetz (IfSG) synonym für Shigatoxin-bildende *E. coli* (STEC) verwendet.

2.2 Sonstige darmpathogene *E. coli*: EPEC, ETEC, EIEC, EAggEC, DAEC

Neben EHEC gibt es noch weitere darmpathogene *E. coli*. Sie können keine Shigatoxine bilden, besitzen aber andere Merkmale für Pathogenität. Entscheidend für die Zuordnung zu den Pathovaren EPEC, ETEC, EIEC, EAggEC und DAEC ist der Nachweis bestimmter Pathogenitätsfaktoren (siehe Tabelle 1). Eine Einordnung der Pathogenität allein nach dem Serotyp ist nicht möglich, da die Serogruppe oder der Serotyp alleine (siehe Serotypisierung) keine Zuordnung zu bestimmten Pathovaren erlauben. Die Zuordnung zu den Pathovaren muss vom meldenden Labor geleistet werden. Die Übermittlungspflicht ist mit der Aktualisierung der Falldefinitionen 2015 entfallen. Bei fraglichen Befunden sollte die Stuhlprobe an das LGL weitergeleitet bzw. eine neue Stuhlprobe veranlasst und an das LGL weitergeschickt werden.

Tabelle 1. Pathogenitätsfaktoren sonstiger darmpathogener *E. coli*:

<i>E. coli</i> -Pathovar	Krankheitsbild	Pathogenitätsfaktor (codierendes Gen)
Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)	Durchfall bei Kindern	Intimin (eae)
Enterotoxische <i>E. coli</i> (ETEC)	Reisedurchfälle	Hitzelabiles Toxin (lt) Hitzestabiles Toxin (st)
Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)	Shigellose-ähnliche Erkrankung	invasin plasmid antigen H (ipaH)
Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAggEC)*	Durchfall bei Kindern	aggR, EAST-1 Ggf. nach Angabe des Labors, Methodik nicht evaluiert
Diffus adhärierende enteropathogene <i>E. coli</i> (DAEC)*	Durchfall bei Kindern	daaC Ggf. nach Angabe des Labors, Methodik nicht evaluiert

3 Labordiagnostik

3.1 Ablauf

Das Ausgangsmaterial für die EHEC-Diagnostik ist i.d.R. eine native Stuhlprobe, die im Labor in geeigneten (Flüssig-)Medien inkubiert wird, um bevorzugt *E. coli* anzuzüchten. Dabei wachsen harmlose und auch darmpathogene *E. coli* an, die sich äußerlich nicht voneinander unterscheiden lassen. Die charakteristische Eigenschaft, die einen harmlosen *E. coli* von einem gefährlichen EHEC unterscheidet, ist die Fähigkeit Shigatoxine zu bilden. In einem ersten Schritt wird deshalb die Anreicherungskultur bzw. Mischkultur auf Shigatoxine hin untersucht. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten: (i) Nachweis der Shigatoxine direkt in der Stuhlanreicherung mit immunologischen Methoden (EIA/ELISA) oder (ii) Nachweis der Shigatoxingene mit molekularbiologischen Verfahren (PCR). Weitere Gene für Pathogenitätsfaktoren, die auf das Vorhandensein anderer Pathovaren hindeuten, können zeitgleich oder nacheinander in diesem Stadium der Analyse untersucht werden.

Wurde in der Mischkultur Shigatoxin nachgewiesen, sollte in jedem Fall eine Isolierung der EHEC-Stämme in Reinkultur angestrebt werden, um diese Stämme dann noch genauer (z.B. durch Serotypisierung oder molekulare Feintypisierung) zu charakterisieren. Das ist aufwändig, und die Primärdiagnostik in niedergelassenen Laboren endet häufig nach dem Shigatoxin(gen)nachweis aus der Stuhlanreicherung bzw. Mischkultur. Am LGL wird die Isolierung der EHEC-Stämme bei jedem neuen EHEC-Fall versucht. Bei erfolgreich gewonnenen EHEC-Stämmen werden dann die Gene der Pathogenitätsfaktoren Intimin (*eae*) und Hämolysin (*hlyA*) untersucht und die wichtigsten Serotypen (O157, O26, O103, O111, O145) bei besonderer Schwere der Krankheit (z.B. beim hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS)) oder bei Ausbrüchen molekularbiologisch bestimmt.

3.2 Ausgangsmaterial für die Labordiagnostik

3.2.1 Stuhlanreicherung/Mischkultur

Zur Untersuchung, ob bei einem Patienten eine Infektion mit EHEC vorliegt, wird in der Regel eine Stuhlprobe an ein Labor geschickt. Im Labor wird ein Teil der Probe in ein spezielles Nährmedium eingebracht, in dem selektiv *E. coli* wachsen können (Stuhlanreicherung bzw. Mischkultur). Dieses so beimpfte Nährmedium wird über Nacht bei 37°C bebrütet. Anschließend kann der Nachweis von Shigatoxin (Stx) 1 und/oder Stx 2 mit ELISA erfolgen (siehe 2.3.1). Alternativ kann das Shigatoxingen *stx 1* und/oder *stx 2* mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden (siehe 2.3.2).

Gleichzeitig oder im Anschluss an diesen Nachweis kann die Probe auf weitere Pathogenitätsfaktoren untersucht werden. So kann bei Ausschluss von EHEC der Nachweis von anderen darmpathogenen *E. coli*-Keimen erfolgen.

3.2.2 Isolat / Reinkultur

Ein Isolat erhält man aus der Stuhlanreicherung oder der Mischkultur, in dem davon eine kleine Menge auf eine Platte mit speziellem, festem Nährmedium ausgestrichen und bebrütet wird. Im fraktionierten Ausstrich bilden sich im Regelfall Einzelkolonien. Wird eine Einzelkolonie von der Platte abgenommen und in ein Nährmedium überführt, gewinnt man ein (Erreger-)Isolat. Das Isolat wird auch Reinkultur genannt, weil es einen Bakterienzelltyp bzw. Pathogenitätstyp in Reinform enthält. Die Gewinnung eines Isolats in Reinkultur ist die Voraussetzung für weitere Typisierungsverfahren und sollte daher bei jeder mikrobiologischen Untersuchung angestrebt werden. Um sicher zu gehen, dass es sich bei der gewonnenen Reinkultur wirklich um ein EHEC-Isolat handelt, muss aus dieser der Nachweis von Shigatoxin mittels ELISA bzw. von Shigatoxin-Genen mittels PCR erfolgen. Für andere darmpathogene *E. coli*-Stämmen gilt dies entsprechend für ihre jeweiligen Pathogenitätsfaktoren. Ist der Nachweis positiv, sollte idealerweise eine Serotypisierung am Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger am RKI erfolgen, da Routinelabore i.d.R. nicht über das gesamte Spektrum von Testseren verfügen.

3.2.3 Serum (nur bei HUS-Fällen)

Bei der schweren Verlaufsform der EHEC-Erkrankung HUS, kann bei einem Teil der Fälle EHEC im Stuhl nicht mehr direkt nachgewiesen werden, da es sich um ein klassisches postinfektiöses Syndrom handelt. Die Patienten scheiden bei dieser Erkrankung meistens nur über eine kurze Zeit den Erreger aus. Um trotzdem den Nachweis erbringen zu können, dass die Erkrankung durch EHEC bedingt war, besteht die Möglichkeit, im Serum der Patienten nach Antikörpern gegen einige häufig hiermit assoziierte Serotypen (O-Antigen) von *E. coli* zu suchen. Mit dieser Methode wird indirekt eine Infektion mit bestimmten EHEC-Typen nachgewiesen. Am Nationalen Referenzzentrum für Salmonellen und andere Enteritiserreger am RKI und im Konsiliarlabor für HUS am Institut für Hygiene der Universitätsklinik Münster können derzeit Infektionen mit EHEC O157 serologisch nachgewiesen werden. Diese Nachweismethode sollte dann versucht werden, wenn bei eindeutiger Symptomatik der Nachweis im Stuhl negativ war. Sinnvoll ist hierbei die Testung von zwei Seren im Abstand von 14 Tagen, um einen Titeranstieg bewerten zu können.

3.3 Nachweismethoden

Vorbemerkung: Um in der Schreibweise zwischen Gen und Genprodukt unterscheiden zu können, wird das Gen immer klein und kursiv geschrieben, z.B. *stx1* für das Shigatoxin 1-Gen. Das Genprodukt (Protein, z. B. Shigatoxin) dagegen wird mit großem Anfangsbuchstaben und nicht kursiv geschrieben, z.B. Stx 1 für das Shigatoxin 1. Die nachfolgend dargestellten Methoden sollen helfen, die Grundzüge der komplexen Labordiagnostik zu verstehen.

3.3.1 Proteinnachweis am Beispiel Shigatoxin

Mit dieser Methode können Shigatoxine in einer Stuhlanreicherung, Mischkultur oder einem Isolat nachgewiesen werden. Es wird in der Regel nicht zwischen Shigatoxin (Stx) 1 und 2 unterschieden.

EIA ist die Abkürzung von **Enzymimmunoassay**, eine Variante davon ist der ELISA (**enzyme-linked immunosorbent assay**). Dabei werden die Genprodukte der Shigatoxingene, die Proteine Shigatoxin I und II, nachgewiesen. Die Grundlage dieser Methode stellen artifiziell hergestellte Antikörper gegen diese Proteine dar. Das Verfahren nutzt die Fähigkeit dieser Antikörper, über spezifische Erkennungsstrukturen mit dazu passenden Antigenen eine feste Bindung einzugehen (Antigen-Antikörper-Reaktion).

Die Antikörper, welche die Shigatoxine erkennen, sog. Anti-Shigatoxin-Antikörper, werden an die Wände geeigneter Reaktionsgefäße gekoppelt. Sie werden als Matrixantikörper bezeichnet. Wird dann eine Probe, die Shigatoxine enthält, in das Reaktionsgefäß gegeben, binden enthaltene Shigatoxine an diese Matrixantikörper. Die Erfassung dieser gebundenen Komplexe erfolgt durch Zugabe weiterer Anti-Shigatoxin-Antikörper, die durch Markierung mit Enzymen über eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden. Diese Antikörper werden Zweit- oder Detektionsantikörper genannt. Da bei der Methode das zu testende Antigen (Shigatoxin) von zwei Seiten gebunden wird, spricht man auch von einem Sandwich-ELISA.

Eine positive Probe liefert einen Farbumschlag (z.B. von farblos nach blau oder gelb je nach Art der verwendeten Enzymsubstrate). Durch Vergleich mit entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen kann die Auswertung durch spektrophotometrische Messung erfolgen.

Wichtig: Ist ein ELISA/EIA-Nachweis in der Stuhlanreicherung oder Mischkultur positiv, handelt es sich nach den RKI-Falldefinitionen lediglich um einen EHEC-Verdacht, der nicht übermittlungspflichtig ist. Es sollte in jedem Fall eine Erregerisolierung mit anschließendem ELISA-Nachweis im Isolat durchgeführt werden. Alternativ kann ein DNA-Nachweis (siehe DNA-Nachweis) für Shigatoxin-Gene durchgeführt werden. Eine Erregerisolierung mit anschließender Serotypisierung sollte immer angestrebt werden.

3.3.2 DNA-Nachweis am Beispiel des Shigatoxin-Gens

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können DNA-Abschnitte vervielfältigt werden. Diese Methode wird zum Nukleinsäurenachweis eingesetzt.

Prinzip der PCR:

Möchte man z.B. das Vorliegen des *stx1*- oder *stx2*-Gens nachweisen, muss die normalerweise doppelsträngige DNA durch Erhitzen in ihre beiden Einzelstränge zerlegt werden. Durch Zugabe des Enzyms Polymerase und von kurzen, einzelsträngigen DNA-Stücken, sog. Primern, die sich speziell nur an Bereiche in den *stx1*- bzw. *stx2*-Genabschnitten anlagern können, kann der bestimmte Genabschnitt vervielfältigt (amplifiziert) werden. Dieses Vorgehen wird mehrmals wiederholt, bis eine ausreichende Menge an *stx1*- bzw. *stx2*-DNA produziert wurde (= Amplifikat). Diese DNA-Stücke können durch Färbung mittels verschiedener Verfahren sichtbar gemacht werden und sind der labordiagnostische Nachweis dafür, dass in der vorliegenden Probe *stx1* oder *stx2* oder auch beide Gene vorhanden sind. Verglichen wird immer mit einer Kontroll-DNA.

Ist das nachzuweisende Gen in der Probe nicht vorhanden, kann der spezifische Primer nicht binden und es entsteht kein Amplifikat. Die Probe wird als negativ beurteilt.

Wichtig: Der Nachweis von *stx1* und/oder *stx2* gilt nach den RKI-Falldefinitionen als labordiagnostische Bestätigung einer EHEC-Infektion unabhängig davon, ob der Nachweis aus der Stuhlanreicherung, Mischkultur oder aus dem Isolat erfolgte. Eine Erregerisolierung mit anschließender Serotypisierung sollte dennoch immer angestrebt werden, um epidemiologische Zusammenhänge aufzuklären und weitere Charakterisierungen des Stammes durchführen zu können.

3.3.3 Serotypisierung

Auf ihrer Oberflächenmembran besitzen alle *E. coli*-Stämme unabhängig von ihrer Pathogenität eine charakteristische Oberflächenstruktur, das Lipopolysaccharid (LPS) oder O-Antigen. Bis heute lassen sich ca. 180 verschiedene O-Antigene unterscheiden. Die häufigsten O-Antigene von EHEC sind O157, O26 und O103. Zusätzlich kann die *E. coli*-Bakterienzelle Geißeln für ihre Fortbewegung tragen, die sich wiederum in über 50 verschiedene sog. H-Antigene unterscheiden lassen. Hat ein Bakterium keine Geißel, so ist es unbeweglich und es kann kein H-Antigen nachgewiesen werden. Dies wird mit H- oder Hnm bezeichnet (gesprochen: H minus oder non-motile). Das O-Antigen definiert den Serotyp, O- und H-Antigen zusammen ergeben das *E. coli*-Serovar.

Zur Bestimmung der O- und H-Antigene werden Antiseren (Testseren) gegen diese Oberflächenstrukturen der Bakterien benötigt. Sie sind in einer begrenzten Zahl in den Routinelaboratorien vorhanden und kommerziell erhältlich. Dadurch ist eine

Zuordnung zu einem Serotyp (O-Antigen) oder zu einem Serovar (O-Antigen:H-Antigen) möglich.

In den letzten Jahren wurde die phänotypische Serotypisierung mit Antiseren zunehmend durch molekularbiologische Methoden abgelöst. Es werden dabei die für die Biosynthese des LPS verantwortlichen Gene mit PCR-Verfahren untersucht. Diese Methodik wird Genoserotypie genannt.

Wichtig: Aussagen zum Serotyp (O-Antigen) oder zum Serovar (O-Antigen: H-Antigen) sind nur spezifisch, wenn ihre Bestimmung mit einem Isolat durchgeführt wurde, in dem auch der Nachweis des Pathogenitätsfaktors erfolgte. Dieser Anforderung nicht gerecht würde z.B. eine Labormeldung eines Shigatoxin-nachweises aus Stuhl und nachfolgender Meldung, dass ein O26 gefunden wurde. In diesem Fall geht aus der Labormeldung nicht hervor, ob der Serotyp (hier O26) aus einem Isolat mit Shigatoxin(gen)-Nachweis bestimmt wurde. Deshalb müsste in diesem Fall beim Labor die durchgeführte Labordiagnostik erfragt und ggf. nachgearbeitet werden.

Ausnahme: Ein O157 O-Antigennachweis ist in Verbindung mit dem Shigatoxin(gen)-Nachweis nicht nur aus dem Isolat, sondern auch aus der Mischkultur übermittlungspflichtig (Falldefinitionen des RKI, 2015)

3.3.4 Next Generation Sequencing (NGS)

Unter dem Namen „next generation sequencing“ (NGS) werden einige neuartige genanalytische Verfahren zusammengefasst, die eine sehr große Anzahl von DNA-Molekülen parallel sequenzieren können. Nach einer erfolgreichen Sequenzierung steht grundsätzlich die Information des gesamten Bakteriengenoms zur Verfügung. Da der Zeitaufwand und die Kosten für die Entschlüsselung eines Bakteriengenoms in den letzten Jahren kontinuierlich gesunken sind, hat diese Methode bisherige Verfahren zum Vergleich von Isolaten wie z.B. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) abgelöst. NGS steht den Referenzlaboren, aber auch dem LGL zu Verfügung und kann bei besonderen Fragestellungen wie z. B. Ausbruchsuntersuchungen angewandt werden.

3.4 Kommentierung der Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts und Eingabe in die Meldesoftware

Für die folgende Darstellung wurden die „Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern Ausgabe 2019“ verwendet. Anhand der Falldefinitionen zu *Escherichia coli*, enterohämorrhagisch (EHEC-Erkrankung), *Escherichia coli*, sonstige darmpathogene Stämme (*E. coli*-Enteritis) und Hämolytisch-urämisches Syndrom, enteropathisch soll dargestellt werden, wie die Kriterien der Falldefinition in die Meldesoftware eingetragen werden können.

Im Nachfolgenden wird die Schreibweise so übernommen, dass sie mit der RKI-Falldefinition und der RKI-Meldesoftware SurvNet übereinstimmt.

3.5 Meldung einer klinischen Erkrankung

Einzig das rein klinisch nachgewiesene HUS ist auch ohne Erregernachweis oder mit unzureichendem Erregernachweis (nur ein positiver Shigatoxinnachweis (Proteinnachweis) aus der Stuhlanreicherung – siehe Schaubild, Anhang 1) als nur klinisch diagnostizierte Erkrankung an die Landesstelle übermittlungspflichtig. Es müssen mindestens zwei der drei HUS-Symptome erfüllt sein (siehe Tabelle). Bitte auch die „Checkliste HUS“ im Anhang beachten. Für das Erkrankungsbild EHEC (Bauchschmerzen, Durchfall, Erbrechen) ohne einen labordiagnostischen Nachweis entfällt die Übermittlung nach §11.

3.6 Meldung eines labordiagnostischen Nachweises

Am Gesundheitsamt eingegangene Meldungen eines labordiagnostischen Nachweises einer EHEC-Infektion oder HUS-Erkrankung können anhand des Schaubildes zur Übermittlung von Fallmeldungen für enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC), im Anhang 1 überprüft werden. Bei Meldung einer HUS-Erkrankung bitte auch die „Checkliste HUS“ im Anhang 2 beachten.

3.6.1 EHEC-Erkrankung

Die Falldefinition für den labordiagnostischen Nachweis von EHEC ist erfüllt, wenn Shigatoxin mit mindestens einem der drei folgenden Toxinnachweise festgestellt wurde:

- Nachweis von Shigatoxin (z.B. ELISA) aus der *E. coli* Kultur aus Stuhl (entspricht Stx-Nachweis (ELISA/EIA) aus Isolat / Reinkultur / *E. coli* Kultur),
- Bei Nachweis des O157-Antigens: Nachweis von Shigatoxin (z.B. ELISA) aus Stuhlanreicherungskultur, Stuhlmischkultur oder *E. coli* Kultur aus Stuhl (entspricht *stx*-PCR oder Stx-ELISA/EIA) aus Stuhlprobe, Mischkultur/Stuhlanreicherungskultur oder aus einem Isolat / Reinkultur / *E. coli* Kultur)
- Nukleinsäurenachweis (z.B. PCR) eines Shigatoxin-Gens aus Stuhlanreicherungskultur, Stuhlmischkultur oder *E. coli* Kultur aus Stuhl (entspricht *stx*-PCR aus Stuhlprobe, Mischkultur/Stuhlanreicherungskultur oder aus einem Isolat / Reinkultur / *E. coli* -Kultur)

Hinweis: Falldefinition

Für alle EHEC Nachweise gilt die Referenzdefinition nur bei Vorliegen des klinischen Bildes (Eingabe in Software: Klinische Informationen verfügbar: „Ja“; Erkrankungsbeginn: „Datum“; infiziert / kolonisiert: „infiziert“; Symptome: „zutreffende ankreuzen“ (mindestens 1 Symptom)) als erfüllt. Asymptomatische Ausscheider sind ebenfalls an das LGL übermittlungspflichtig, werden aber nicht nach Referenzdefinition (Erkrankungsfall) veröffentlicht.

3.6.2 Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)

Als labordiagnostischer Nachweis einer HUS-Erkrankung gilt nach der Falldefinition **ein** positiver Befund bei mindestens einer der fünf folgenden Untersuchungen:

Toxinnachweis:

- Nachweis von Shigatoxin (z.B. ELISA) aus der *E. coli* Kultur aus Stuhl (entspricht Stx-Nachweis (ELISA/EIA) aus Isolat / Reinkultur / *E. coli* Kultur),
- Bei Nachweis des O157-Antigens: Nachweis von Shigatoxin (z.B. ELISA) aus Stuhlanreicherungskultur, Stuhlmischkultur oder *E. coli* Kultur aus Stuhl (entspricht *stx*-PCR oder Stx-ELISA/EIA) aus Stuhlprobe, Mischkultur/Stuhlanreicherungskultur oder aus einem Isolat / Reinkultur / *E. coli* Kultur)
- Nukleinsäurenachweis (z.B. PCR) eines Shigatoxin-Gens aus Stuhlanreicherungskultur, Stuhlmischkultur oder *E. coli* Kultur aus Stuhl (entspricht *stx*-PCR aus Stuhlprobe, Mischkultur/Stuhlanreicherungskultur oder aus einem Isolat / Reinkultur / *E. coli* Kultur)

oder

indirekter (serologischer) Nachweis:

- Nachweis von Anti-LPS-IgM-Antikörpern gegen *E. coli*-Serogruppen (einzelner ► deutlich erhöhter Wert; z.B. ELISA, Immunblot),
- Nachweis von Anti-LPS-IgG-Antikörpern gegen *E. coli*-Serogruppen (► deutliche Änderung zwischen zwei Proben; z.B. ELISA).

3.6.3 *E. coli* Enteritis

Die Übermittlungspflicht ist seit 2015 entfallen.

3.7 Epidemiologische Bestätigung

Eine epidemiologische Bestätigung liegt dann vor, wenn mindestens einer der vier folgenden Nachweise unter Berücksichtigung der Inkubationszeit (EHEC 2-10 Tage, HUS: Latenzzeit zwischen Beginn der Magen-Darm-Beschwerden und enteropathischem HUS bis zu ca. 2 Wochen) erbracht werden kann:

- epidemiologischer Zusammenhang mit einer labordiagnostisch nachgewiesenen Infektion beim Menschen durch:
 - o Mensch-zu-Mensch-Übertragung ODER
 - o gemeinsame Expositionsquelle (z.B. ► Badegewässer und Wasser aus Bädern, ► Lebensmittel, ► Tierkontakt)
- Baden in einem labordiagnostisch nachgewiesenen kontaminierten Gewässer oder Schwimm- oder Badebecken,
- Kontakt mit einem labordiagnostisch nachgewiesenen infizierten Tier (z.B. Streichelzoo) oder seinen Ausscheidungen, oder Verzehr seiner Produkte (z.B. Rohmilch),
- Verzehr eines Lebensmittels (z.B. Rohmilch, Trinkwasser), in dessen Resten Shigatoxin-bildende Erreger labordiagnostisch nachgewiesen wurden.

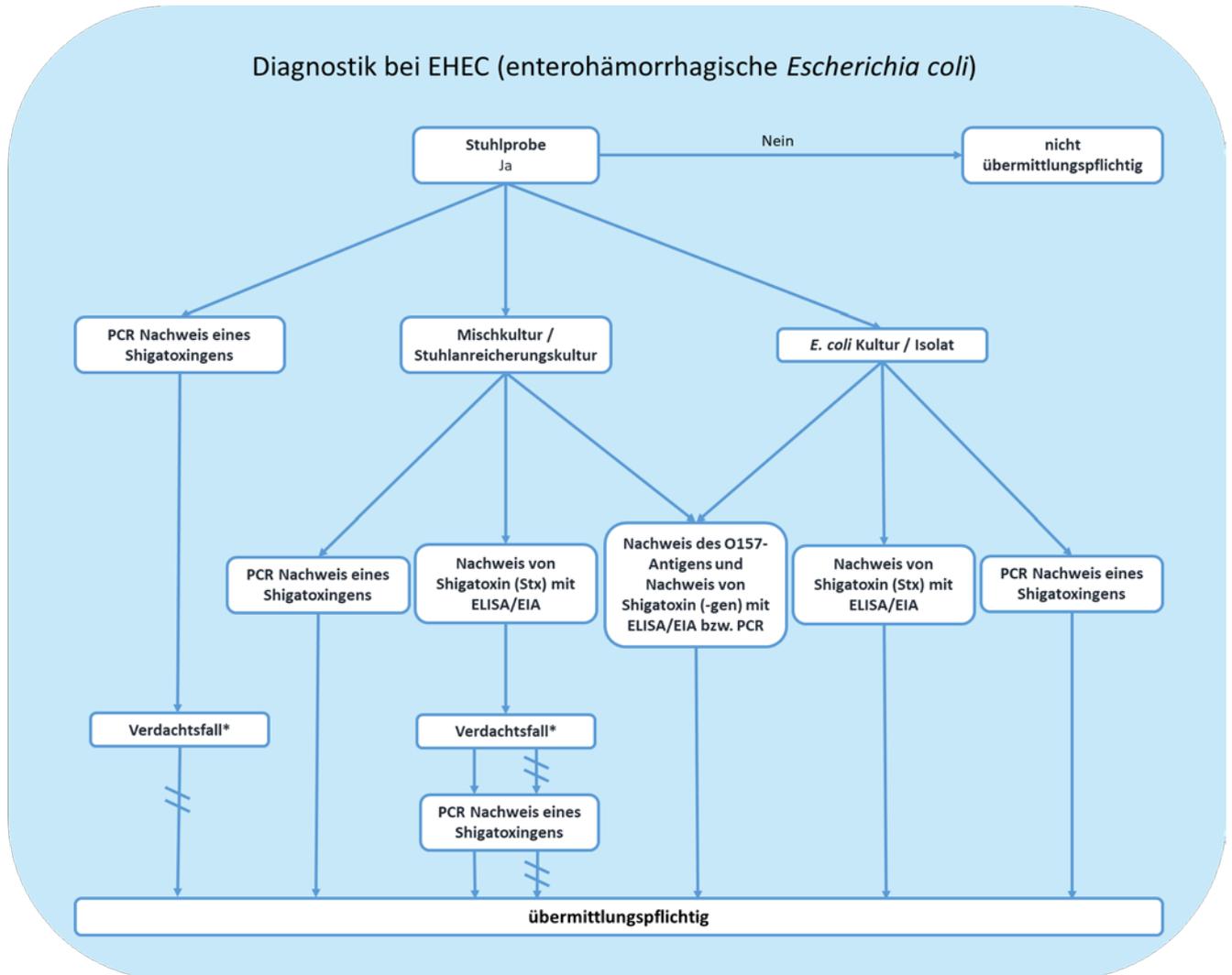
Die Referenzdefinition für epidemiologisch bestätigte Fälle ist erfüllt bei klinisch und / oder labordiagnostisch bestätigten Fälle.

4 Literatur

RKI, Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern, Ausgabe 2019
Fruth A; Richter H, Timm M, Streckel W, Klie H, Prager R, Reissbrodt R, Gallien P, Skiebe E, Rienäcker I, Karch H, Bockemühl J, Perlberg KW, Tschäpe H, Zur Verbesserung der gegenwärtigen bakteriologischen Diagnostik von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Bundesgesundhbl. 4:310-317, 2000

5 Anhang

Anhang 1: Schaubild zur Übermittlung von Fallmeldungen für enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC)



*Abklärung von Verdachtsfällen am LGL: das Gesundheitsamt veranlasst den Versand der Original-Stuhlprobe oder einer frischen Stuhlprobe ans LGL.

Anhang 2: Checkliste HUS

Checkliste hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)

Wichtig: HUS ist bereits als **klinische Diagnose** ohne Erregernachweis melde- und übermittlungspflichtig!

Prüfen der am Gesundheitsamt eingegangenen Arzt-/Klinikmeldung:

Übermittlungspflichtig als HUS,

wenn spezifisches klinisches Bild eines akuten enteropathischen HUS, definiert als mindestens zwei der drei folgenden Kriterien:

- Hämolytische Anämie,
- Thrombozytopenie ≤ 150.000 Zellen/mm³,
- Nierenfunktionsstörung

oder

wenn unspezifisches klinisches Bild eines akuten enteropathischen HUS, definiert als mindestens eines der beiden folgenden Kriterien:

- ärztliche Diagnose eines akuten enteropathischen HUS,
- krankheitsbedingter Tod

aufgetreten ist (vgl. RKI-Falldefinition 2019, S.73)

Sowohl für Übermittlungen als auch für Nachmeldungen aufgrund neuer Erkenntnisse sind jeweils erforderlich:

- Falldaten nach IfSG (elektronisch mit Übermittlungssoftware)
- ggf. bzw. wenn für die Ermittlungen hilfreich Fragebogen „Intensivierte Surveillance des enteropathischen hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) in Bayern (Meldung einer HUS-Erkrankung)“

per Email: ifsg-meldezentrale@lgl.bayern.de

Veranlassung von Laboruntersuchungen:

Wichtig: Bitte immer im Untersuchungsantrag vermerken:

“HUS-Fall“ bzw. “Bezug zu HUS-Fall“ + Patientencode des HUS-Erkrankten

- Stuhlprobe des Erkrankten an das LGL
- Stuhlproben der Familienmitglieder und enger Kontaktpersonen des Falles an das LGL
- Bei Hinweisen auf mögliche Infektionsquellen: Veterinär-, Lebensmittel- und Umweltproben an das LGL

Übermittlung aller Laborbefunde mit Zusammenhang zum HUS-Fall:

- Meldung aller relevanten Labornachweise, die mit dem HUS Fall in Verbindung stehen nach IfSG (elektronisch mit Übermittlungssoftware)

6 Glossar

Apathogen: keine Krankheiten hervorrufend

Bakterienchromosom: Erbsubstanz in der Bakterienzelle

DNA: Desoxyribonukleinsäure, Träger der Erbinformation

EIA, ELISA: Enzymimmunoassay; Enzyme-linked Immunosorbent Assay:
immunologisches Nachweisverfahren

Flagelle: Geißel von Bakterien, dient der Fortbewegung

Genoserotypie: molekularbiologisches Verfahren zur Bestimmung des O-Antigens
und damit des Serotyps

H-Antigen: Geißelprotein (Flagellin), das in Bakteriengeißeln vorkommt

Intimin: Protein, das die Anheftung der Bakterienzelle an das Schleimhautepithel
vermittelt und deshalb als wichtiger Pathogenitätsfaktor bei EHEC und EPEC gilt.

Isolat: syn, Reinkultur: Bakterienkultur, die durch Vermehrung einer einzigen
Bakterienzelle entsteht

LPS: Lipopolysaccharid, Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer
Bakterien

NGS: next generation sequencing, neuartiges genanalytisches Verfahren zum
parallelen Sequenzieren großer Mengen an DNA-Molekülen

O-Antigen: Oligosaccharidketten, Bestandteil des Lipopolysaccharids der äußeren
Zellmembran gramnegativer Bakterien, an diese Oberflächenstrukturen binden
spezifische Antikörper

Pathogen: Krankheit verursachender Mikroorganismus (Bakterien, Pilze, Viren)

Pathogenitätsfaktor: Eigenschaft, die Krankheiten auslöst

PCR: Polymerase-Kettenreaktion, Verfahren zur gezielten Vervielfältigung von DNA-
Abschnitten

Plasmid: ringförmiges DNA-Molekül, das zusätzlich zum Hauptchromosom in
Bakterienzellen vorhanden sein kann, enthält häufig Gene für Antibiotikaresistenzen
und Pathogenitätsfaktoren

Reinkultur: syn. Isolat, Bakterienkultur, die durch Vermehrung einer einzigen
Bakterienzelle entsteht

Serotyp: Mittel zur weiteren Klassifikation von Mikroorganismen unterhalb der Art,
bei Bakterien beruht der Serotyp auf den Oberflächenstrukturen (O-Antigen), die mit
spezifischen Antikörpern unterschieden werden können.

Shigatoxin: Zellgift, das von manchen *E. coli* (EHEC) oder Shigellen gebildet
werden kann.

Toxin: ein Gift, das von einem Lebewesen produziert wurde

**Bayerisches Landesamt für
Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL)**

Eggenreuther Weg 43
91058 Erlangen

Telefon: 09131 6808-0

Telefax: 09131 6808-2102

E-Mail: poststelle@lgl.bayern.de

Internet: www.lgl.bayern.de