

Anwendung voltammetrischer Verfahren zur Spurenelementbestimmung in klinischen Proben: „Eine kritische Bewertung der Möglichkeiten und Grenzen“

Application of voltammetric techniques to trace element analysis in clinical samples: „A critical overview on the capacity and the limitations“

P. Schramel, S. Hasse

GSF – Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, GmbH, Institut für Ökologische Chemie, Neuherberg, Deutschland

Zusammenfassung:

Neben der grundsätzlichen Beschreibung der verschiedenen elektrochemischen Techniken wird vor allem auf die notwendige Probenvor- und -aufbereitung (Probenaufschluß) eingegangen. Beispiele und „State of the art“ des Probenaufschlusses illustrieren die Schwierigkeiten, um die volle Leistungsfähigkeit der Methoden ausnutzen zu können und um „richtige“ Ergebnisse zu erhalten. Von den bekannten essentiellen Spurenelementen sind vor allem die Elemente Co, Cu, Ni, und Zn für klinische Proben im interessierenden Konzentrationsbereich zu messen. Die Voltammetrie stellt grundsätzlich eine Multielementmethode dar, jedoch ist in den meisten Fällen mit der Standard-Additionsmethode auszuwerten, was neben der aufwendigen Probenaufbereitung das Verfahren relativ zeitaufwendig macht. Deshalb ist die Methode für ein „normales“ klinisch-chemisches Labor nicht als Routineverfahren anzusehen.

Schlüsselwörter:

Voltammetrie – Klinische Proben – Probenaufschluß

Summary:

Besides the description of the different electrochemical techniques, the necessary sample preparation (destruction of the organic matrix) will be discussed. Some practical examples and „the state of the art“ in sample digestion techniques, illustrate the difficulties in using the full capacity of the methods and for obtaining „true“ results. Co, Cu, Ni, and Zn are the elements, looking at the well known essential trace elements, which can be analyzed in the intensity concentration range normally occurring in clinical samples by the voltammetric techniques. Principally, voltammetry is a multielement technique, but the evaluation of the data has to be done normally by the standard-addition method. The latter and the expensive sample preparation make the technique relatively time consuming. Therefore, the method is not to be seen as a routine analytical technique for the „normal“ clinical chemical laboratory.

Keywords:

Voltammetry – clinical samples – digestion of organic samples

Einleitung

Polarographie und Voltammetrie sind die beiden wichtigsten elektrochemischen Verfahren für die Spurenanalyse. Neben einer ganzen Reihe von Elementen sind auch organische Substanzen mit diesen Techniken nachweisbar. Die Nachweisgrenzen bewegen sich, je nach Verfahren und Element, im Bereich von 10^{-6} – 10^{-11} mol/l. Die Bestimmungen erfolgen mit, im Vergleich zu anderen spurenanalytischen Methoden, preiswerten und leistungsfähigen kom-

merziell erhältlichen Geräten. Allerdings ist bei den hier interessierenden Matrices – klinische Proben (Körperflüssigkeiten und Gewebe) – immer ein Probenaufschluß, also eine Zerstörung der organischen Matrix, notwendig. Dabei ist die Leistungsfähigkeit der elektrochemischen Verfahren sehr stark abhängig von der „Qualität“ der zur Verfügung stehenden Aufschlußlösung. Geringe Reste der organischen Matrix, die z.B. bei den meisten atomspektroskopischen Verfahren keinen störenden Einfluß auf den quantitativen und qualitativen Nachweis haben,

verschlechtern hier ganz erheblich die Nachweisgrenzen und auch die Spezifität der Methode.

Methoden

Beschreibung der Meßverfahren

Der Unterschied zwischen Polarographie und Voltammetrie liegt in den Elektroden. IUPAC empfiehlt den Begriff *Polarographie* nur für jene Methoden zu verwenden, bei denen Strom-Spannungskurven an flüssigen Elektroden aufgenommen werden, deren Oberfläche (z. B. DME = Dropping Mercury Electrode oder SMDE = Static Mercury Dropping Electrode) periodisch oder kontinuierlich während des Meßvorganges erneuert wird. Die unteren Bestimmungsgrenzen liegen im Bereich von 10^{-7} mol/l. Unter *Voltammetrie* (Volt-am(pero)-metrie) sollen diejenigen Verfahren verstanden werden, die Strom-Spannungsbeziehungen an stationären Elektroden (Fest-Elektroden) aufnehmen. Die HMDE (Hanging Mercury Drop Electrode) ist eine typische Elektrode der Voltammetrie.

Es gibt eine ganze Reihe unterschiedlichster Techniken. Für die Analytik haben aber die differentielle Pulspolarographie (DPP), die differentielle Pulsvoltammetrie (DPV) und die differentielle Pulsinversvoltammetrie (DPIV) die größte Bedeutung erlangt. Abhängig davon, ob mit kathodischer oder anodischer Anreicherung gearbeitet wird und folglich in anodischer bzw. kathodischer Richtung die angelegte Spannungsrampe bei der Aufnahme der Voltammogramme verläuft, unterscheidet man anodische bzw. kathodische DPIV (im englischen Schrifttum DPASV = differential pulse anodic stripping voltammetry oder DPCSV = differential pulse cathodic stripping voltammetry). Der Einbau dieser Verfahren in moderne kostengünstige Geräte hat bewirkt, daß diese Technik heute eine echte methodische Alternative in der Spurenanalyse (für anorganische und organische Substanzen) geworden ist. Alle Techniken beruhen auf dem Faradayschen Gesetz, wonach 1 Mol einer in einem Elektrodenprozeß umgesetzten Substanz der elektrischen Ladung von $n \cdot 96500$ C (Coulomb) entspricht. n ist dabei die Zahl der Übergangselektronen und kann – je nach Substanz – ganzzahlige Werte zwischen 1 und 6 annehmen (häufig 2). Darauf beruht die hohe Nachweisempfindlichkeit, die gute Genauigkeit und vor allem die inhärent hohe Richtigkeit der Verfahren. Sie gehören zu den Multielementmethoden (gleichzeitige Bestimmung mehrerer Substanzen) und sind grundsätzlich nicht nur *elementspezifisch*, sondern auch *substanzspezifisch* (Möglichkeiten für die „Speziation“).

Bei allen polarographischen und voltammetrischen Verfahren läuft an einer geeigneten Elektrode der Prozeß



der zu bestimmenden Substanz O bzw. R in reduktiver oder oxidativer Richtung ab. Hierbei liegt in der Analytlösung jeweils nur O bzw. R vor, während das jeweilige Produkt des Elektrodenprozesses, R bei Reduktion bzw. O bei Oxidation, erst in dessen Verlauf an der Phasengrenze Elektrode/Lösung gebildet wird. Im Prinzip sind die Messungen also Elektrolysen, bei welchen die Spannungen an

der Arbeitselektrode verändert, die auftretenden Ströme in Funktion der angelegten Spannung registriert werden (Strom-Spannungskurven = Voltammo- bzw. Polarogramme) und die elektroaktiven Spezies hauptsächlich durch Diffusion an die Elektrodenoberfläche gelangen.

Als Arbeitselektroden werden je nach Problemstellung die bereits erwähnten Quecksilber-Elektroden aber auch solche aus Gold, Graphit, Glaskohlenstoff oder Kohlepaste eingesetzt.

Hinsichtlich der verschiedenen möglichen Meßverfahren in Polarographie und Voltammetrie muß auf die einschlägige Literatur verwiesen werden [1–4].

Als Hilfselektrode dient bei allen Verfahren in der Regel ein Platindraht. Als Referenz- oder Bezugselektrode werden üblicherweise die Kalomelektrode ($Hg/Hg_2Cl_2/KCl$) oder die Silber/Silberchlorid-Elektrode ($Ag/AgCl/KCl$ oder $Ag/AgCl/KNO_3$) eingesetzt.

In der extremen Spurenanalyse wird heute – aufgrund ihrer Leistungsfähigkeit – hauptsächlich die Inverse Voltammetrie (engl.: stripping voltammetry) eingesetzt. Diese Stripping-Methoden bestehen grundsätzlich aus 2 Arbeitsschritten:

a) der Vorelektrolyse, also einer elektrochemischen Anreicherung der zu bestimmenden Spezies an einer geeigneten stationären Elektrode unter konstanter und geicherter Konvektion der Analysenlösung während einer definierten Zeit (lange Anreicherungszeit verbessert dabei natürlich die Nachweisgrenzen) bei einer von der Spezies abhängigen geeigneten Spannung.

b) der Abelektrolyse, dem eigentlichen Meßvorgang, bei welchem die an der Elektrode angereicherten Spezies durch kontinuierliche Änderung der Elektrodenspannung wieder in Lösung gebracht werden. Bei den Pulsverfahren werden dieser kontinuierlichen Spannungsänderung je nach Technik noch Impulse von einstellbarer Dauer und Höhe überlagert.

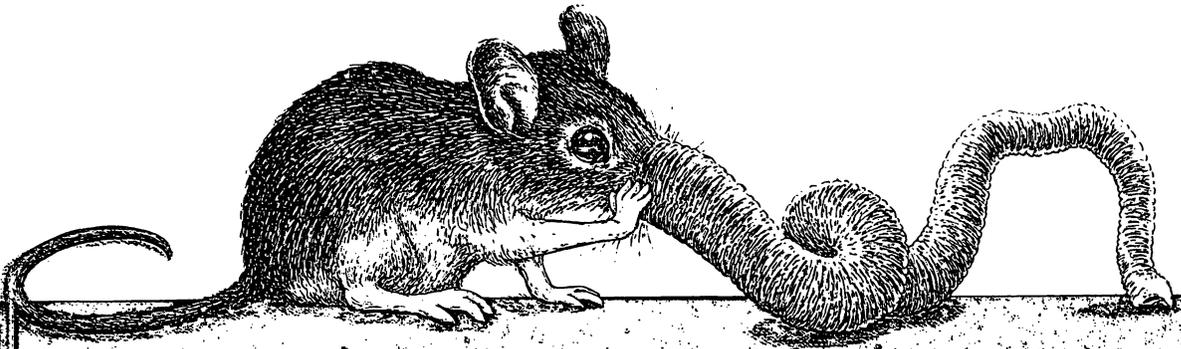
Die aufgenommenen Strom-Spannungskurven zeigen Stromspitzen (proportional der Konzentration) in Funktion der Elektrodenspannung, die zur qualitativen Charakterisierung der Spezies dient. Die erreichbaren Nachweisgrenzen liegen bei diesem Verfahren bis zu etwa 10^{-11} mol/l.

Die Auswertung erfolgt bei allen Techniken – aufgrund von Matrixunterschieden zwischen wäßrigem Standard und unbekannter Probe, die das Voltammogramm beeinflussen – meist über das Verfahren der Standard-Addition [2, 4]. Sie eignet sich hier besonders gut, da sich aufgrund des Faradayschen Gesetzes die Konzentration der zu bestimmenden Spezies in der Meßlösung nicht meßbar ändert und deswegen der Meßvorgang beliebig oft wiederholt werden kann (aus derselben Lösung).

Probenaufschluß

Der Probenaufschluß (= Zerstörung der organischen Matrix) stellt den wichtigsten Schritt bei der Spuren-

Die Hemans, leider ausgestorben

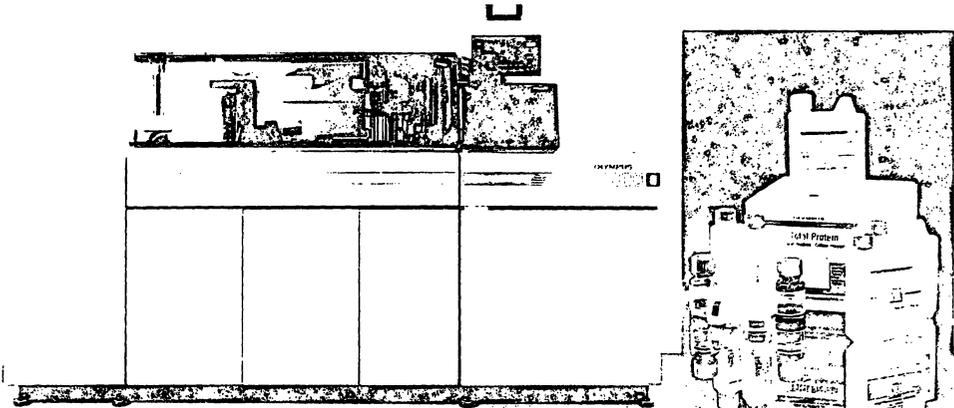


Nicht alles paßt
so gut zusammen
wie unsere Geräte
und Reagenzien.

FOCUS ON PEOPLE
OLYMPUS

Olympus AU 800

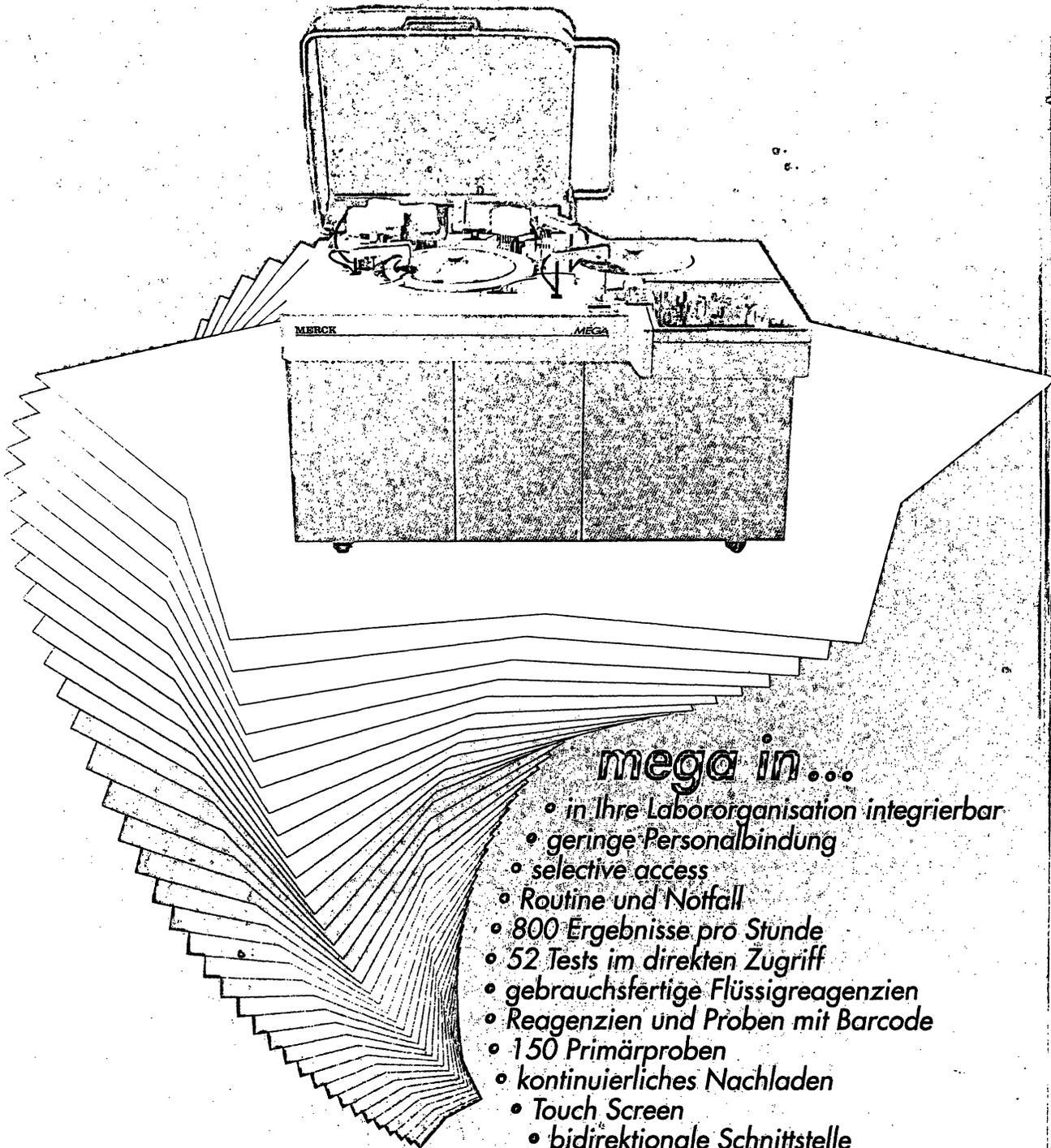
Olympus
System Reagenz 800



Olympus AU 800 und Olympus System Reagenz 800
sowie, die zusammenpassen.

Ja, das könnte mir so passen...

MERCK MEGA®



mega in...

- in Ihre Labororganisation integrierbar
- geringe Personalbindung
- selective access
- Routine und Notfall
- 800 Ergebnisse pro Stunde
- 52 Tests im direkten Zugriff
- gebrauchsfertige Flüssigreagenzien
- Reagenzien und Proben mit Barcode
- 150 Primärproben
- kontinuierliches Nachladen
- Touch Screen
- bidirektionale Schnittstelle

... in Ihrem klinisch-chemischen Labor

Probenname: Milchpulver
 Einwaage: 300 mg
 Aufschluß: Seif-App.
 4.0 ml HNO₃
 500 µl HClO₄
 100 µl H₂SO₄
 Aliquot: 100 %

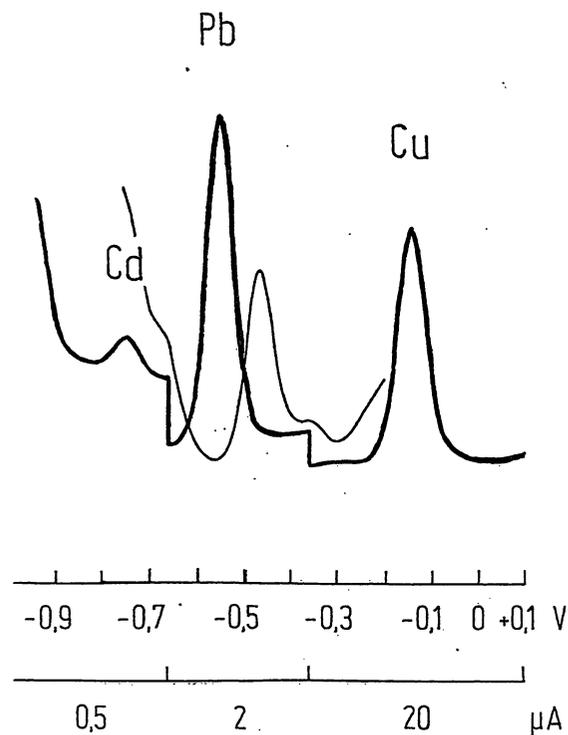


Abb. 1: Beispiel für ein Voltammogramm bei unvollständiger bzw. vollständiger Zerstörung der organischen Matrix

elementanalyse mittels Polarographie und Voltammetrie dar, da geringe Reste der organischen Matrix ein Voltammogramm und damit die Nachweisgrenze entscheidend verschlechtern [5]. Die Peak-Form eines Voltammogrammes liefert eine Aussage über die „Qualität“ eines Aufschlusses. Asymmetrische Peaks, Peakpotentialverschiebungen, Peakdepressionen (bei Standard-Addition gut zu sehen) und Störpeaks können ein Hinweis auf eine nicht vollständig zerstörte organische Matrix sein. Diese für die Voltammetrie notwendige Qualität wird für die Atomspektroskopie (AAS, AES etc.) nicht benötigt. Hier reicht meist eine „klare“ Aufschlußlösung aus, da verbleibende organische Reste bei der Bestimmung thermisch zerstört werden.

Ein hohes oxidatives Potential ist daher notwendig, um den Restkohlenstoffgehalt der Probelösung (= Maß für Zerstörung der organischen Matrix) möglichst weit unter 1% zu bringen. Bei normalen Säureaufschlüssen mit HNO₃ oder Säuregemischen, offen oder im geschlossenen

Probenname: Vollblut
 Einwaage: 125.0 mg (Trockengew.)
 Aufschluß: HPA/2
 2.0 ml HNO₃
 250 µl HClO₄
 50 µl H₂SO₄
 Aliquot: 90 %
 Std.-Add.-Cd: 2.0 ng
 -Pb: 20.4 ng
 Ergebnis-Cd: 3.5 ng/g
 -Pb: 241 ng/g

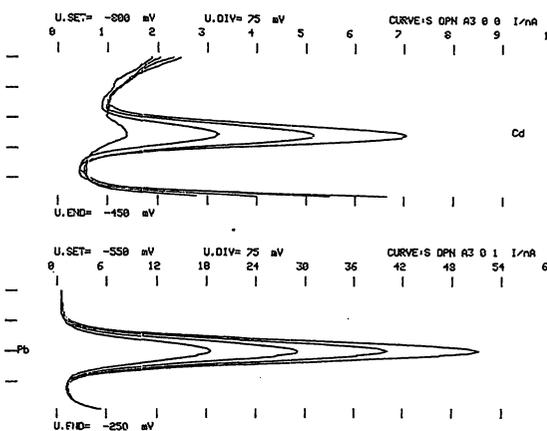


Abb. 2: Cd- und Pb-Bestimmung in Vollblut

System bei mittleren Drücken bis etwa 20 bar und Temperaturen um 170°C (Teflon!) reicht das Oxidationspotential meist nicht aus, um eine vollständige Zerstörung der organischen Matrix zu gewährleisten. Eine Nachbehandlung mit HClO₄ ist daher fast immer notwendig (Abb. 1) [5].

Entscheidend bessere Aufschlußlösungen erhält man durch Erhöhung des Oxidationspotentials (3 Parameter: Säureart, Temperatur, Druck). Allgemein muß man aber sagen, daß es wie oft in der Analytik kein universelles „Kochrezept“ gibt, nach dem es möglich ist, alle Problemstellungen hinsichtlich der Matrix (Probe) oder der zu bestimmenden Elemente – auch abhängig vom Konzentrationsbereich – zu lösen. Jede organische Matrix muß deshalb gesondert untersucht werden.

Wesentliche Vorteile – hinsichtlich des erreichbaren Oxidationspotentials brachten der Hochdruckverascher HPA (nach G. Knapp [6]) und der Hochdruckmikrowellenverascher IPMD (nach G. Knapp [7]). Der HPA erlaubt Veraschungen in Quarzgläsern bei einem Druck bis zu 100 bar und einer Temperatur bis zu 320°C. Bei Verwendung der 30 ml Aufschlußgefäße können Probenmengen von 100–300 mg Trockensubstanz eingewogen werden. Ein Säuregemisch (2 ml HNO₃ + 250 µl HClO₄ + 50 µl H₂SO₄) reicht dann aus, die Proben – in Abhängigkeit von der

Übersicht

Tab. 1: Verwendete Materialien für den Aufschluß im PMD und „Qualität“ der Aufschluß-Lösungen

Matrix	SRM-No.
Bovine muscle	BCR-184
Bovine liver	BCR-185
Cod muscle	BCR-422
Mussel tissue	BCR-278
Brown bread	BCR-191
Milk powder	BCR-63R
Lobster hepatopancreas	TORT-1
Red cabbage	-
Spruce needles	BCR-101
Whole blood	-
Urine	-
Cooking Oil	-
Human breast milk	-

Samples in PMD Power/Time (%) (min)	1	1	2	2	2
	60/10	80/10	60/10	80/10	100/10
BCR-184		+		+	+
BCR-185		+		-	-
BCR-422		+		-	-
BCR-63R		+		+	+
Red cabbage		+		+	+
Whole blood	+			-	-
Urine		+		-	-
Cooking oil	+		-	-	-
Human breast milk	+			-	+

Tab. 2: Veraschungsparameter für verschiedene Matrices im PMD

Material	Sample Intake (mg)	Acid	Microwave Power (%)
BCR-184	100	2.0 ml HNO ₃ 0.5 ml HClO ₄	80
BCR-185	100	2.0 ml HNO ₃ 0.5 ml HClO ₄	80
BCR-422	100	2.0 ml HNO ₃ 0.5 ml HClO ₄	80
BCR-278	100	2.0 ml HNO ₃ 0.5 ml HClO ₄	80
BCR-191	100	2.0 ml HNO ₃ 0.5 ml HClO ₄	80
BCR-63R	250	2.0 ml HNO ₃ 0.5 ml HClO ₄	80
TORT-1	100	2.0 ml HNO ₃ 0.5 ml HClO ₄	80
Red cabbage	100	2.5 ml HNO ₃	80
BCR-101	100	2.0 ml HNO ₃ 0.5 ml HClO ₄	80
Whole blood	1.0 ml	1.0 ml HNO ₃ 0.5 ml HClO ₄	60
Urine	1.0 ml	1.0 ml HNO ₃	80
Cooking oil	0.1 ml	2.0 ml HNO ₃ 0.2 ml H ₂ SO ₄	60
Human breast milk	1.0 ml	1.0 ml HNO ₃ 0.5 ml HClO ₄	60

Matrix bei verschiedenen Temperaturen-vollständig zu zerstören. Eine Nachbehandlung mit Perchlorsäure ist hier nicht mehr erforderlich. Lediglich muß die Salpetersäure bei 180–200°C abgeraucht werden. Der Rückstand wird mit wenig (ca. 20 µl) HClO₄ oder HCl und z. B. 10 ml deionisiertem Wasser aufgenommen und stellt die Probe-lösung dar. Während für den Aufschluß von pflanzlichem Material eine Endtemperatur von 250°C meist ausreichend ist, werden für die hier interessierenden Matrices wie Serum, Vollblut, Muttermilch, Urin und Gewebe mindestens 280°C benötigt [7]. Bei höheren Pb-Konzentrationen (> 1 µg/g) muß eventuell auf die Zugabe der Schwefelsäure verzichtet werden, da dann die Gefahr besteht, daß Bleisulfat ausfällt und damit ein zu niedriger Pb-Wert analysiert wird.

Die Abb. 2 zeigt die Pb- und Cd-Bestimmung in Vollblut. Die symmetrische Peakform bestätigt, daß die organische Matrix vollständig zerstört wurde.

Bei den heute vielverwendeten Mikrowellen-Aufschluß-apparaturen, die ohne oder bis zu mittleren Drücken arbeiten, ergeben sich keine für die Voltammetrie befriedigenden Aufschlußlösungen. Auch hier wird eine deutliche Erhöhung des Oxidationspotentials durch eine Erhöhung des Druckes erreicht. Der bereits erwähnte PMD (Pressurized Microwave Digestion), bei dem zusätzlich die Mikrowelle über den Druck (max. 85 bar) gesteuert wird, liefert von den kommerziell erhältlichen Geräten die besten Ergebnisse. Beachten muß man auch die Tatsache, daß in Mikrowellen-Aufschlußgeräten, bei denen der

gleichzeitige Aufschluß mehrerer Proben (mit Drehteller etc.) möglich ist, meist die insgesamt zur Verfügung stehende Leistung nicht ausreicht, um von der „Qualität“ des Aufschlusses einer Probe auf die Qualität bei der gleichzeitigen Veraschung mehrerer Proben zu schließen. Auch beim PMD, der für 2 Proben vorgesehen ist, reicht bei einigen organischen Matrices die Leistung für die Veraschung von 2 Proben gleichzeitig nicht aus (Tab. 1).

Auch hier ist kein universelles „Kochrezept“ für alle organischen Matrices angebar. Eine Erarbeitung der geeigneten Aufschlußparameter hinsichtlich des Säuregemisches und der Mikrowellenleistung ist notwendig. Die Tabelle 2 zeigt unterschiedliche organische Proben und die für die Voltammetrie optimalen Aufschlußparameter.

Insgesamt liefert der PMD eine zum HPA vergleichbare „Qualität“ der Aufschlußlösung. Alle interessierenden Körperflüssigkeiten und Gewebeproben werden gemäß den Anforderungen der elektrochemischen Verfahren in befriedigender Weise aufgeschlossen. Allerdings sprechen Zeitaufwand/Probe und der erhebliche Preisvorteil eindeutig für den PMD.

Diskussion

Von den essentiellen Spurenelementen können voltammetrisch (anodic oder cathodic stripping) Co, Cu, Fe, Ni und Zn in Körperflüssigkeiten und Gewebeproben

Schwerpunkte polarographisch/
voltammetrischer Elementanalytik

Abb. 3: Schwerpunkte polarographisch/voltammetrischer Elementanalytik

analysiert werden, wobei diese Technik vor allem bei den Elementen Co und Ni den spektroskopischen Verfahren (GFAAS, ICP etc.) aufgrund der normalerweise sehr niedrigen Konzentration überlegen ist. Von der arbeitsmedizinisch- bzw. umweltrelevanten Problemstellung können Schwermetalle u.a. wie Cd, Hg, Pb, Tl und Sb bestimmt werden.

Die Abb. 3 zeigt einen Überblick über die schwerpunktmäßig erfassenden Spurenelemente. Prinzipiell sind natürlich eine ganze Reihe weiterer Elemente mit diesen Techniken nachweisbar.

Die elektrochemischen Verfahren sind hinsichtlich ihrer Nachweisstärke in vielen Fällen den atomspektroskopischen Verfahren überlegen. Allerdings sind die Anforderungen an die Probenvorbereitung (Probenaufschluß und Herstellung einer geeigneten Meßlösung) sehr viel größer, so daß mehr chemisches Wissen bzw. Erfahrung vorliegen muß. Ein großer Vorteil ist die Möglichkeit der gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Elemente und die Verfügbarkeit preiswerter und leistungsfähiger kommer-

zieller Geräte. Ein Nachteil ist, daß die Messungen durch die aufwendigere Probenvorbereitung (Probenaufschluß in allen hier interessierenden Matrices ist immer Voraussetzung) und durch die Verwendung der Standard-Additionsmethode relativ zeitaufwendig sind. Zur Ausnutzung der vollen Leistungsfähigkeit und zur Erzielung „richtiger“ Analysenergebnisse ist zur Vermeidung von Kontaminationen bei der Probenvor- und -aufbereitung, Lagerung und Messung unter Reinstraumbedingungen (z.B. Verwendung von Laminar-Flow-Werkbänken) zu arbeiten. Diese Faktoren zusammen lassen es zumindest schwierig erscheinen, diese Verfahren in der Routine – z.B. in einem klinisch-chemischen Labor – einzusetzen.

Ein zusätzlicher Vorteil liegt natürlich in der Möglichkeit, eine ganze Reihe von organischen Substanzen ebenfalls mit diesen Verfahren nachzuweisen.

Literatur:

1. Wang, J. (1985) Stripping Analysis. VCH Publishers, Deerfield Beach.
2. Rach, P., Seiler, H. (1985) Polarographie und Voltammetrie in der Spurenanalytik. Hüthig Verlag, Heidelberg.
3. Nürnberg, H. W. (1981) Differentielle Puls polarographie, Pulsvoltammetrie und Pulsinversvoltammetrie, in: Analytiker-Taschenbuch Band 2 (Eds.: Bock, R., Fresenius, W., Günzler, H., Huber, W., Tölg, G.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
4. Meites, L. (1965) Polarographie Techniques, Kap. 4 in: Theory of the Current-Potential Curve. Interscience Publisher, New York.
5. Hasse, S., Schramel, P. (1983) Voltammetric Determination of Cd, Cu, Co, Ni and Pb in Milkpowder and Other Biological Materials with Special Regard to the Ashing Method, Mikrochimica Acta (Wien) III, 449–455.
6. Schramel, P., Hasse, S., Knapp, G. (1987) Einsatz des Hochdruckveraschers HPA nach Knapp für die voltammetrische Bestimmung von Spurenelementen in biologischem Material, Fresenius Z. Anal. Chem. 326, 142–145.
7. Schramel, P., Hasse, S. Destruction of organic materials by pressurized microwave digestion, Fresenius Z. Anal. Chem., im Druck.

Anschrift für die Verfasser:

PD Dr. P. Schramel
S. Hasse
GSF-Forschungszentrum
für Umwelt und Gesundheit, GmbH
Institut für Ökologische Chemie Neuherberg
85758 Oberschleißheim

Multiprimer-PCR als Screeningverfahren zum Nachweis der Toxingene LTI, STI, VTI und VTII bei E. coli-Pathotypen

Multiprimer PCR as a screening method for the detection of the toxin genes LTI, STI, VTI and VTII in E. coli pathotypes

B. Schütz¹, B. Hack², K. Keiner¹, K. Zimmermann¹, V. Rusch¹

¹ Institut für Mikroökologie, Institut für Mikrobiologie und Biochemie, Herborn, Deutschland

² Institut für Mikrobiologie und Biochemie, Herborn, Deutschland

Zusammenfassung:

Über Enterotoxine vermögen pathogene E. coli-Stämme schwere Diarrhoen hervorzurufen. Routineverfahren (immunologische Nachweisverfahren, Gensondentechniken) erfassen nur einzelne Toxinklassen, -typen oder -subtypen. Ein Screeningverfahren, wie die Multiprimer-PCR, das nahezu alle beim Menschen vorkommenden Toxintypen und Subtypen berücksichtigt, existiert bisher nicht. Basierend auf bekannten Gensequenzen wurden drei Primerpaare synthetisiert, mit deren Hilfe vorhandene Toxingene für LTI, STI, VTI und VTII innerhalb eines Laufes nachgewiesen werden können. Die amplifizierten PCR-Produkte erscheinen nach Gelaufftrennung und Anfärbung mit Ethidiumbromid als Fragmente einer Größe von 322 (LTI), 105 (STI) und 230 (VTI/II) Basenpaaren. Eine Identifizierung ist über den Vergleich mit Längenmarkern leicht möglich. Die Nachweisempfindlichkeit der PCR wurde über serielle Verdünnungen toxinproduzierender E. coli-Stämme getestet. 10 (STI, VTI/II) bzw. 100 (LTI) Bakterienzellen genügten, um auf einem Agarosegel sichtbare Amplifikationsprodukte hervorzurufen. 45 bekannte E. coli-Stämme wurden parallel zur Multiprimer-PCR, mit immunologischen Tests (ST-EIA und VET-RPLA) und Dot-Blot-Hybridisierungsverfahren auf eine Enterotoxinproduktion hin untersucht. Die Korrelation zwischen den drei Verfahren war ausgezeichnet. Über eine Poolbildung von Bakterienisolaten läßt sich die Kapazität der Multiprimer-PCR erhöhen. Bis zu 1000 E. coli-Stämme lassen sich so innerhalb von 8 Stunden auf das Vorhandensein der entsprechenden Toxingene hin untersuchen.

Schlüsselwörter:

E. coli Stämme – Enterotoxine: STI, LTI, VTI, VTII – Multiprimer PCR – Dot-Blot Hybridisierung – immunologische Nachweisverfahren

Summary:

Pathogenic E. coli strains are able to cause severe diarrheas through enterotoxins. Routine methods (immunological detection methods, gene probe techniques) cover only individual toxin classes, types or subtypes. A screening procedure, such as the multiprimer PCR, which takes account of practically all toxin types and subtypes occurring in man has not previously been available. On the basis of known gene sequences, three primer pairs have been synthesized with which existing toxin genes for LTI, STI, VTI and VTII can be detected within one run. Bacterial isolates serve as starting material. The amplified PCR products appear after gel separation and staining with ethidium bromide as fragments of a size of 322 (LTI), 105 (STI) and 230 (VTI/VTII) base-pairs. An identification is easily possible by comparison with length markers. The sensitivity of the PCR reaction was tested with serial dilutions of toxin-producing E. coli strains. 10 (STI, VTI/VTII) and 100 (LTI) bacterial cells were sufficient to show visible amplification products on an agarose gel. Forty-five known E. coli strains were investigated in immunological tests (ST-EIA and VET-RPLA) and Dot-Blot hybridization procedures for enterotoxin production in parallel with the multiprimer PCR. The correlation between the three methods was excellent. The capacity of the multiprimer PCR can be increased by pooling bacterial isolates. Up to 1000 E. coli strains can thus be tested for the presence of the corresponding toxin genes within 8 hours.

CAP

a-IgE

Werte entscheiden.

Quantitative Allergiediagnostik. Monitoring der Entzündungsaktivität mit ECP.

Pharmacia Biotech GmbH
Lunzinger Str. 9
9111 Freiburg
Tel. 07 61 - 49 03-0


Kabi Pharmacia
Diagnostics



DAKO

Infektionskrankheiten

IDEIA™ und IMAGEN™
– die Wahl für Mikrobiologen

Auf monoklonalen Antikörpern basierende Enzymimmunoassays und direkte Immunfluoreszenzkits von hoher Qualität für den diagnostischen Einsatz

Okulare Infektionen

Chlamydien
Adenovirus
Herpes-simplex-Virus

Infektionen der Atemwege

Respiratory Syncytial Virus
Influenzavirus
Chlamydien
Adenovirus
Parainfluenzavirus Typ 1, 2 & 3

**Besuchen Sie uns
auf der
MEDICA
Halle 1, Stand 1–C 04**

Genitale Infektionen

Chlamydien
Herpes-simplex-Virus

Gastroenteritis

Rotavirus
Cryptosporidium
Adenovirus

DAKO® Diagnostika GmbH
Postfach 70 04 07
22004 Hamburg
Am Stadtrand 52
22047 Hamburg
Telefon: (0 40) 6 93 70 26
Telefax: (0 40) 6 95 27 41

Keywords:

E. coli strains – enterotoxins: STI, LTI, VTI, VTII – multiprimer PCR – Dot-Blot hybridization – immunological tests

Einleitung

Escherichia coli gehört zur Gruppe der fakultativ pathogenen Bakterien. Ca. 90% aller *E. coli*-Stämme sind völlig apathogen. Einige Varianten vermögen jedoch intestinale Infektionen hervorzurufen, die sich klinisch in Form schwerer Diarrhoen manifestieren [1]. Basierend auf verschiedenen Verlaufsformen werden enterotoxische (ETEC), enteropathogene (EPEC), enterohämorrhagische (EHEC) und enteroinvasive *Escherichia coli*-Stämme (EIEC) unterschieden [2, 3]. Voraussetzung für das Auftreten von Diarrhoen ist das Vorhandensein bestimmter Pathogenitätsfaktoren. Es handelt sich hierbei um die Fähigkeit einiger *E. coli* Stämme Haft- oder Adhärenzfaktoren (Adhäsine) auszubilden und spezifische Enterotoxine zu produzieren und zu sezernieren. Enterotoxine lassen sich in drei Klassen einteilen [Verotoxine (VT), hitzlabile Toxine (LT), hitzstabile Toxine (ST)], in Typen und in Subtypen. Der routinemäßige Nachweis von Enterotoxinen erfolgt auf immunologischem Wege [4, 5], über Gensondentechniken [6–9] oder über DNA-Amplifikationsreaktionen (PCR-Technik) [10–13, 14]. Nachgewiesen werden mit diesen Verfahren jedoch i.d.R. nur einzelne Toxinklassen, -typen oder Subtypen. Ein Screeningverfahren, das nahezu alle beim Menschen vorkommenden Toxintypen oder Subtypen berücksichtigt existiert bisher nicht. Unser Ziel war es ein solches Verfahren in Form einer Multiprimer-PCR zu etablieren. Neben einer ausreichend hohen Sensitivität und Spezifität sollte der Test eine Untersuchung von 500 bis 1000 Bakterienisolaten pro Tag ermöglichen. Ein derart hoher Probendurchsatz ist mit etablierten, routinemäßig eingesetzten Verfahren kaum zu erreichen [15, 16].

Material und Methoden

Bakterienstämme. 45 *Escherichia coli*-Stämme mit bekannten Toxinprofilen wurden in der vorliegenden Studie untersucht. Einige Stämme wurden über NCTC (National Collection of Type Cultures, London) bezogen. 15 VT-positive Stämme wurden uns freundlicherweise durch M. Bülte, Institut für Fleischhygiene, Freie Universität Berlin, zur Verfügung gestellt. Bei den verbleibenden Stämmen handelt es sich um klinische Isolate aus menschlichen Stuhlproben.

Synthetische Oligonukleotide. Basierend auf bekannten Gensequenzen [17–21] wurden drei Oligonukleotid-Primerpaare synthetisiert. Mit ihrer Hilfe lassen sich vorhandene Toxingene für VTI, VTII, LTI und STI nachweisen. Die Nukleotidsequenzen der VT-Primer wurden aus der Literatur übernommen [22, 23]. Bei den VT-Primern handelt es sich um degenerative Sequenzprimer. Ihre Oligonukleotidsequenzen stimmen nicht vollständig mit denen der Target-DNA überein (Sequenzhomologie ca. 90%). Aus der Verwendung degenerativer Sequenzprimer einerseits und Unterschieden im GC-Gehalt andererseits ergeben

sich weit auseinanderliegende Annealingtemperaturen. Für VT-Primer liegen sie bei 43°C, für LTI- bzw. STI-Primer bei 55 bzw. 58°C.

Amplifikation der Target-DNA. *Escherichia coli*-Stämme wurden für 18 Stunden bei 37°C in Tryptase Soja Bouillon kultiviert. Die Gesamt-DNA der *E. coli* Stämme wurde isoliert durch Kochen eines Pellets aus ca. 100000 Zellen in 50 µl A. bidest. Nach anschließendem Zentrifugieren (1 min, 10000 g) wurde 5 µl des Überstandes (ca. 1 ng Template DNA) in die PCR eingesetzt. Das Gesamtvolumen eines PCR-Ansatzes betrug 10 µl. Verwendet wurden dünnwandige 0,2 ml Reaktionsgefäße (Verkürzung der Reaktionszeiten). Durch Einsatz des GeneAmp PCR Systems 9600 von Perkin Elmer war eine Überschichtung der Ansätze mit Mineralöl nicht erforderlich.

Die Amplifikation wurde durchgeführt in einem Reaktionspuffer bestehend aus 10 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 und 4 mM MgCl₂ · dNTP- (50 µM) und Primerkonzentrationen (50 pM) wurden bewußt niedrig gewählt, um eine hohe Spezifität zu erreichen. Um die Notwendigkeit einer empirischen Bestimmung optimaler Magnesiumionenkonzentrationen zu umgehen, wurde Stoffel Fragment (Perkin Elmer) eingesetzt [24]. Die verwendete Enzymaktivität lag bei 0,5 bis 1 U pro Ansatz. Um den degenerativen Sequenz-Primern ein Annealing an die Target-DNA zu ermöglichen, gleichzeitig aber ein Mispriming der LTI- oder STI-Primer zu verhindern, wurde der Thermozykler wie in Abbildung 1 beschrieben programmiert. Bei Annealingtemperaturen von 55°C lagern sich LTI- und STI-Primer mit einer hohen Spezifität an die Target DNA an. Entsprechende Genabschnitte werden amplifiziert und stehen in nachfolgenden Zyklen in großer Zahl als Vorlagen zur Verfügung. Die Gefahr eines Misprimings bei niedrigeren Annealing-Temperaturen (43°C) wird dadurch reduziert. Ein Annealing der VT-Primer findet bei 55°C nicht statt. Hierzu sind niedrigere Temperaturen erforderlich (43°C). Ein Nachweis der amplifizierten PCR-Produkte erfolgte nach Gelaufentrennung über eine Anfärbung mit Ethidiumbromid.

Dot-Blot-Hybridisierung. Zum Nachweis von Toxingenen über eine Dot-Blot-Hybridisierung wurden in der Literatur beschriebene Oligo- oder Polynukleotidsonden verwendet [7, 8, 22, 25–28]. Die DNA-Proben wurden markiert mit Digoxigenin-dUTP (DIG DNA Labeling and Detection Kit Nonradioactive, Boehringer Mannheim) [29]. Verwendet wurden dabei die Verfahren Random Priming (Polynukleotidsonden) oder Endmarkierung (Oligonukleotidsonden) [30]. DNA-Isolierung [31] und Durchführung des Blotverfahrens [30] sind in der Literatur beschrieben. Hybridisierung und Detektion erfolgten nach einem Protokoll der Firma Boehringer Mannheim [29, 32].

Immunologische Nachweisverfahren für ST und LT. Alle *E. coli*-Stämme wurden in einem kompetitiven Enzymimmuntest (Oxoid ST EIA Kit) auf die Produktion von STI

Übersicht

PCR-Ansatz bei einem Gesamtvolumen von 10 µl in 0,2 ml Gefäßen, ohne Übersichtung mit 1/10-Verd.

10	ml	KCl
10	ml	Tris-HCl, pH 8,3
1	ml	MgCl ₂
50	µM	dNTPs
50	pmol	Primer
0,5	Unit	Stoffwechsel-Fragment
1	ng	E. coli DNA

PCR-Protokoll:

Programm 1:	initiale Denat.: 2 min.	94° C
	Denaturierung: 15 sek.	94° C
	Annealing: 30 sek.	55° C
	Extension: 30 sek.	72° C
	Zyklen: 5	
Programm 2:	Denaturierung: 15 sek.	94° C
	Annealing: 30 sek.	43° C
	Extension: 30 sek.	72° C
	Zyklen: 25	
	Programm 3:	Denaturierung: 15 sek.
Annealing: 30 sek.		43° C
Extension: 6 min.		72° C
Zyklen: 1		

Abb. 1: Ansatz und Protokoll der Multiprimer-PCR.

hin untersucht. Ein Latex-Agglutinationstest (Oxoid VET-RPLA Kit) ermöglichte den immunologischen Nachweis von LTI-Toxinen [4, 5].

Ergebnisse

Oligonukleotidprimer. Die Ergebnisse einer primervermittelten Amplifikation von LTI-, STI- und VT-Genabschnitten sind in Abbildung 2 dargestellt. 3 Primerpaare ermöglichen in der Multiprimer-PCR den Nachweis von LTI-, STI- und VT-Genen innerhalb eines Laufes. Die amplifizierten PCR-Produkte erscheinen nach Gelauftrennung und Anfärbung mit Ethidiumbromid als Fragmente einer Größe von 322 (LTI), 230 (VTI, VTII) und 105 Basenpaaren (STI).

Sensitivität der Multiprimer-PCR. Die Sensitivität der Multiprimer-PCR im Nachweis enterotoxinbildender E. coli-Stämme wurde geprüft. Aus 18 Stunden-Kulturen LTI-, VT- und STI-positiver Stämme wurden serielle Verdünnungsreihen hergestellt. 100 µl jeder Verdünnung wurde auf Trypase-Soja-Agar ausplattiert und über Nacht gebrütet, um die Zahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) zu bestimmen. Parallel dazu wurden 5 µl der einzelnen Verdünnungsstufen in der Multiprimer-PCR untersucht (Abbildung 3). Die Amplifikationsprodukte der höchsten Verdünnungsstufen wurden auf ein Agarosegel gegeben, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbro-

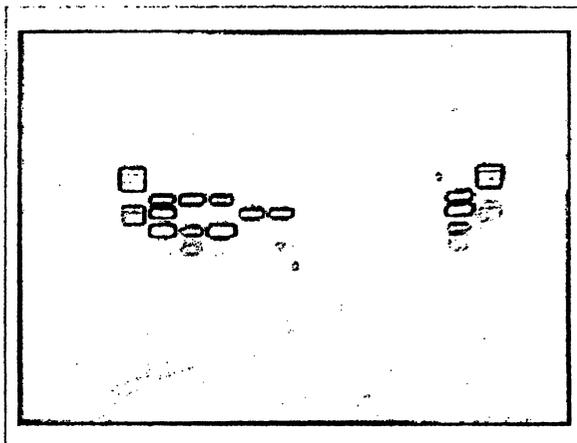


Abb. 2: Ergebnisse einer primervermittelten Amplifikation von LTI-, STI- und VT-Genabschnitten. Slot 1 und 14: Längenstandard V, Slot 2 und 13: Pool aus LTI-, STI- und VT-positiven *Escherichia coli*-Stämmen, Slot 3 und 4: LTI- und STI-positive-Stämme, Slot 5 und 6: VTII produzierende *E. coli*-Stämme. Slot 7 bis 12: nicht toxinbildende Stämme. Die amplifizierten PCR-Produkte erscheinen als Fragmente einer Größe von 322 bp (LTI), 230 bp (VTI, VTII) oder 105 bp (STI).

mid angefärbt. Der Nachweis von STI- oder VT-bildenden Stämmen über die Multiprimer-PCR setzt das Vorhandensein von 7 bzw. 9 KBE voraus. Die Sensitivität des Verfahrens im Nachweis LTI-positiver Stämme scheint etwas geringer zu sein. Hier waren 85 KBE erforderlich, um eine sichtbare Bande im Gel hervorzurufen.

Methodischer Vergleich von Multiprimer-PCR, Dot-Blot-Hybridisierung, ST-EIA und VET-RPLA-TEST. 45 *E. coli*-Stämme mit bekanntem Toxinprofil wurden parallel in Multiprimer-PCR, Dot-Blot-Hybridisierung, ST-Enzymimmuntest und LT-Latexagglutinationstest untersucht. Stammbezeichnungen, Serovare und die Ergebnisse der jeweiligen Testverfahren sind in Abbildung 4 zusammengestellt. Die Multiprimer-PCR weist Toxinklassen (VT) oder -typen (STI, LTI) nach. Über die Dot-Blot-Hybridisierung ist eine weitergehende Differenzierung möglich. Abbildung 5 faßt die Ergebnisse des Methodenvergleichs zusammen. Untersucht wurden 10 VTI-, 14 VTII-, 9 STI-, 3 STII- und 10 LTI-produzierende Stämme. Multiprimer-PCR und Dot-Blot-Hybridisierung erbringen weitgehend vergleichbare Resultate. Während die PCR jedoch alle VT-, STI- und LTI-bildenden Stämme erkannte, versagte die Gensondentechnik in zwei Fällen. STII-produzierende Stämme wurden über die PCR nicht erfaßt, wohl aber über STII-spezifische Oligo- oder Polynukleotidsonden. Der ST-Enzymimmuntest erbrachte positive Testresultate im Falle aller 9 STI-bildenden Stämme. Ebenso wie bei der Multiprimer-PCR wurden jedoch keine STII-Toxine erfaßt. Mit dem LT-Latexagglutinationstest gelang ein Nachweis des hitzelabilen Toxins nur in 50% der Fälle. Ein Grund dafür waren häufig unklare Ergebnisse in Form schwer einzuordnender Agglutinationen. Abbildung 6 läßt somit eine gute Korrelation zwischen PCR, Dot-Blot-Hybridisierung und ST-EIA erkennen. Alle drei Verfahren erbringen im wesentlichen gleiche Resultate.

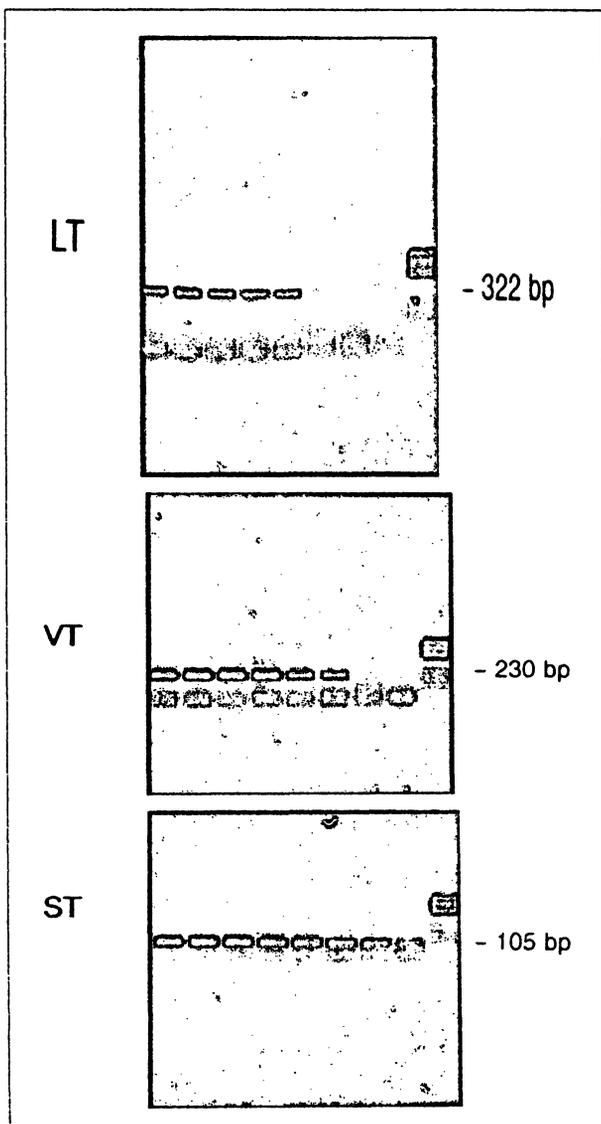


Abb. 3: Untersuchung zur Sensitivität der Multiprimer-PCR im Nachweis enterotoxinbildender *E. coli*-Stämme. Aus Kulturen LTI-, STI- und VT positiver-Stämme wurden serielle Verdünnungsreihen hergestellt und in der Multiprimer-PCR untersucht. Um nach Gelaufftrennung und Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbare Amplifikationsbanden zu erhalten, waren 7 (STI), 9 (VT) oder 85 (LTI) KBE erforderlich.

Diskussion

Der routinemäßige Nachweis von Enterotoxinen bei *Escherichia coli*-Pathotypen erfolgt auf immunologischem Wege [4, 5, 15], über Gensondentechniken [1, 3-8] oder über DNA-Amplifikationstechniken (PCR-Technik) [10, 14, 22]. Nachgewiesen werden jedoch nur einzelne Toxin-klassen, -typen oder -subtypen. Ein Screeningverfahren, wie die vorgestellte Multiprimer-PCR, das nahezu alle humanmedizinisch relevanten Toxintypen und Subtypen berück-

sichtigt, existiert bisher nicht. Mit Hilfe von drei Primerpaaren lassen sich vorhandene Toxingene für LTI, STI, VTI und VTII innerhalb eines PCR-Laufes nachweisen. Toxingene für STII und LTI werden nicht erkannt. LTI-produzierende *Escherichia coli*-Stämme konnten bisher nur vereinzelt aus menschlichen Stuhlproben isoliert werden. Beschrieben wurden lediglich Fälle in Brasilien und Thailand [33, 34]. STII-positive Stämme vermögen bei Schweinen schwere Diarrhoen hervorzurufen [35, 36]. Beim Menschen lassen sie sich nur sehr selten nachweisen [12].

Bei der Multiprimer-PCR handelt es sich um ein sensibles Verfahren. Werden Reinkulturen enterotoxinbildender *E. coli*-Stämme als Target verwendet, reicht das Vorhandensein von weniger 10 (STI, VT) bzw. 100 (LTI) KBE aus, um nach Gelaufftrennung und Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbare Banden hervorzurufen. Die Sensitivität der Multiprimer-PCR ist damit vergleichbar mit der anderer DNA-Amplifikationsverfahren [37-39]. Durch Blotting der Amplifikationsprodukte auf eine Filtermembran und einer anschließenden Hybridisierung mit LTI-spezifischen Oligonukleotidsonden läßt sich die untere Nachweisgrenze für LTI deutlich herabsetzen. Eine weitere Möglichkeit, Sensitivität und Spezifität des Verfahrens zu erhöhen, besteht in der Verwendung innerer Primersets im Rahmen einer Nested-PCR. In einer ersten PCR-Reaktion werden dabei vorhandene Toxingene für LTI, STI und VT nachgewiesen. In einer zweiten Reaktion erfolgt die Differenzierung in die Toxintypen VTI und VTII oder in die Subtypen STIa und STIb [40].

Bei dem vorgestellten Test handelt es sich um ein Verfahren mit einer hohen Spezifität. In einer Studie wurden 45 *E. coli*-Stämme mit bekanntem Toxinprofil parallel in Multiprimer-PCR, Gensondentechnik, ST-Enzymimmunttest und LT-Latexagglutinationstest untersucht. Die PCR erkannte alle vorhandenen Toxingene für LTI, STI und VT. Falsch negative und falsch positive Ergebnisse wurden nicht beobachtet. Mit der Multiprimer-PCR lassen sich pro Tag etwa 100 Bakterienisolate auf Enterotoxine hin untersuchen. Durch Poolbildung läßt sich der Probendurchsatz deutlich erhöhen (ca. 1000 Bakterienisolate/Tag).

Im Rahmen eines routinemäßigen Einsatzes der Multiprimer-PCR empfiehlt es sich, PCR-Reaktionsansätze (Puffer, MgCl₂, dNTPs, Primer, Enzym) vorzufertigen und mit Wachs zu überschichten (AmpliWax PCR Gem 100, Perkin Elmer). In diesem Zustand sind sie bei 4°C über Wochen hinweg haltbar. Bei Bedarf werden die vorgefertigten Ansätze entnommen und die Template DNA auf die Wachs-schicht gegeben. Während der initialen Denaturierung schmilzt das Wachs und die Template DNA gelangt in das Reaktionsgemisch. Die Vorteile dieses Vorgehens liegen in verkürzten Testvorbereitungszeiten und einem Anstieg von Sensitivität und Spezifität durch Einsatz der Hot Start Technik.

Die Multiprimer-PCR erfüllt somit alle Anforderungen, die vorab an sie gestellt wurden. Sie erfaßt nahezu alle humanmedizinisch relevanten Toxintypen. Sie verfügt über eine hohe Sensitivität und Spezifität und ermöglicht einen hohen Probendurchsatz. Darüber hinaus ist die

Übersicht

Abb. 4: Untersuchung von bekannten *E. coli*-Stämmen mit Multiprimer-PCR, Gensondentechnik (DNA-Dot-Blot-Hybridisierung), ST-Enzymimmunttest und LT-Latexagglutinationstest.

Nr.	Stamm	Serovar	PCR	Dot-Blot-Hybr.	ST-EIA	LT-Latex
1	T 173	O22:H8	VT	VTII	-	-
2	T 427	O82:H8	VT	VTI / VTII	-	-
3	T 464	O116:H21	VT	VTI / VTII	-	-
4	T 710	O126:H20	VT	VTII	-	-
5	B1840	O136:H12	VT	VTI	-	-
6	B2098	O113:H21	VT	VTII	-	-
7	B2115	O139:H8	VT	-	-	-
8	B2156	O136:H12	VT	VTI	-	-
9	B2266	O116:H21	VT	VTII	-	-
10	B2405	O22:H8	VT	VTI	-	-
11	B2430	O116:H21	VT	VTI / VTII	-	-
12	B2479	O126:H20	VT	VTII	-	-
13	B2481	O126:H21	VT	VTII	-	-
14	B2482	O157:H7	VT	VTII	-	-
15	B2391	n.t.	VT	VTI	-	-
16	NCTC12079	O157:H7	VT	VTI / VTII	-	-
17	NCTC12080	O157	VT	VTII	-	-
18	595013	n.t.	VT	VTI	-	-
19	595050	n.t.	VT	VTII	-	-
20	595074	n.t.	VT	VTII	-	-
21	NCTC11602	O159:H34	STI / LTI	STI / LTI	ST	LT
22	NCTC11603	O166:H27	STI	STI	ST	-
23	NCTC11601	O7:H18	LTI	LTI	-	LT
24	NCTC11633	O81:H27	-	-	-	-
25	B5693	O7:H27	STI	STI	ST	-
26	B2985	O159	STI / LTI	STI / LT	ST	-
27	B7486	O101	STI	STI	ST	-
28	B11016	O81:H27	-	-	-	-
29	B3853	n.t.	-	-	-	-
30	595088	O7:H27	-	STII	-	-
31	596456	O149	-	STII	-	-
32	596776	O159	LTI	LTI	-	-
33	596978	O6	STI / LTI	STI / LTI	ST	LT
34	597992	O6	STI / LTI	STI / LTI	ST	LT
35	598067	O78	STI / LTI	STI / LTI	ST	-
36	598564	O99	STI	STI	ST	-
37	599002	O153	-	-	-	-
38	600045	O89	-	STII	-	-
39	600342	O153	LTI	-	-	LT
40	600675	O153	LTI	LTI	-	-
41	600862	O153	LTI	LTI	-	-
42	Sym2/1	rauh	-	-	-	-
43	Sym2/2	rauh	-	-	-	-
44	Sym2/3	O35	-	-	-	-
45	Sym2/4	O35	-	-	-	-

Abb. 5: Untersuchung von bekannten *E. coli*-Stämmen mit Multiprimer-PCR, Gensondentechnik (Dot-Blot-Hybridisierung), ST-EIA und Latexagglutinationstest – Zusammenfassung

	Anzahl	PCR	Dot-Blot-Hybr.	ST-EIA	LT-Latex.
VTI	10	10 / 10	9 / 10	-	-
VTII	14	14 / 14	14 / 14	-	-
STI	9	9 / 9	9 / 9	9 / 9	-
STII	3	0 / 3	3 / 3	0 / 3	-
LT	10	10 / 10	9 / 10	-	5 / 10

Multiprimer-PCR mit einem vergleichsweise geringen Kostenaufwand verbunden. So schlägt die Untersuchung eines Bakterienisolates mit nur 0,15 DM zu Buche, ein Betrag, der über andere Verfahren kaum zu erreichen ist.

Schrifttum:

- Bohnert, M. G., D'Hauteville, H. M., Sansonetti, P. (1988) Detection of enteric pathotypes of *Escherichia coli* by using six DNA probes. *Annal. Inst. Pasteur/Microbiol.* 139, 189–202.
- Levine, M. M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155, 377–389.

Sollte die Broschüre "Wer mit Ihnen gemeinsame Wege geht, um diagnostische Fragen besser zu lösen..." fehlen, senden Sie uns bitte den Coupon oder eine Postkarte.

Bitte schicken Sie mir umgehend die Broschüre "Wer mit Ihnen gemeinsame Wege geht, um diagnostische Fragen besser zu lösen...."

Name

Vorname

Straße

PLZ, Ort

Telefon

Coupon bitte einsenden an

Behringwerke AG

Med. Information und Verkauf

Postfach 12 12

65832 Liederbach

BD 031339

Medica 93

Halle 3
Stand 3D47

NEU

Behringwerke AG
35034 Marburg

Behringwerke AG
Med. Information und Verkauf
Postfach 1212
65832 Liederbach

BEHRING
S. Behring

BIO-RAD

Ihr Partner in der Qualitätskontrolle

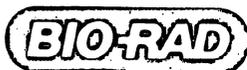


**Kennen Sie schon unseren
neuen Spezialkatalog:
"Kontrollen und verwandte
Produkte"?**

Neben der umfassenden
Kontrollpalette für das klinische
Labor enthält er wichtige
Informationen und wertvolle
Hinweise, wie z.B.

- Richtlinien der Bundesärztekammer
- Qualitätskontrollstatistik
- Westgard Regeln
- Fehlersuche und Beseitigung

Fordern Sie noch heute Ihr
Exemplar an!
Telefonnummer 089/31884144



BIO-RAD
Laboratories GmbH
Klinische Diagnostik
Heidemannstraße 164
D-80939 München
Telefon: 089/31884148
Telefax: 089/31884100

LABORATORIUMS MEDIZIN

vereint mit **Das Medizinische
Laboratorium**

**Einladung
zum
Abonnement**

Offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Laboratoriumsmedizin e. V.
Offizielles Organ des Berufsverbandes Deutscher Laborärzte e. V.
Offizielles Organ der Österreichischen Gesellschaft f. Laboratoriumsmedizin
Offizielles Organ des Institutes für Standardisierung und Dokumentation
im medizinischen Laboratorium e. V. (INSTAND e. V.)

Wir laden Sie ein, diese Fachzeitschrift für 2 Ausgaben kostenlos kennen-
zulernen.

Ein Jahresabonnement 1994 kostet 159,50 DM.

Wir garantieren Ihnen, daß Sie berechtigt sind, diese Vereinbarung inner-
halb einer Woche durch Mitteilung an den Verlag Kirchheim, Kaiserstraße
41, 55116 Mainz, zu widerrufen. Zur Wahrung der Frist genügt die rechtzei-
tige Absendung des Widerrufs. Die Frist beginnt mit Aushändigung der
Vertragskopie einschließlich der Widerrufsbelehrung.

**VERLAG
KIRCHHEIM**

MAINZ Postfach 25 24 · 55015 Mainz

Sie erhalten umgehend Ihr erstes Heft.



Bitte senden Sie mir ab sofort 2 Ausgaben von LABORATORIUMSMEDIZIN, ver-
einigt mit „Das Medizinische Laboratorium“, für mich kostenlos zur Probe.

Gebe ich Ihnen 10 Tage nach Erhalt des zweiten Heftes keine gegenteilige Nach-
richt, bin ich mit der regelmäßigen Weiterbelieferung bis auf Widerruf ein-
verstanden. Ich zahle dann den Abonnementpreis von 14,50 DM pro Aus-
gabe = 159,50 DM im Jahr.

Ich nehme Ihr Angebot an und möchte die Probehefte an folgende Anschrift
erhalten:

Name: _____

Straße: _____

PLZ: _____

Ort: _____

Datum: _____

Unterschrift: _____

Sie garantieren mir, daß ich berechtigt bin, diese Vereinbarung schriftlich inner-
halb einer Woche durch Mitteilung an den Verlag Kirchheim, Kaiserstraße 41,
55116 Mainz, zu widerrufen. Zur Wahrung der Frist genügt die rechtzeitige Ab-
sendung des Widerrufs. Die Frist beginnt mit Aushändigung der Vertragskopie
einschließlich der Widerrufsbelehrung.

Datum und Unterschrift

Lab.med. 11/93

3. Franco, B. D. G. M., Gomes, T. A. T., Jakabi, M., Marques, L. R. M. (1991) Use of probes to detect virulence factor DNA sequences in *Escherichia coli* strains isolated from foods. Intern. J. Food Microbiol. 12, 333-338.
4. Carroll, P., Woodward, M. J., Wray, C. (1990) Detection of LT and ST1a toxins by latex and EIA tests. Vet. Rec. 127, 335-336.
5. Scotland, S. M., Willshaw, G. A., Rowe, B. (1989) Identification of *Escherichia coli* STa by a commercially available enzyme-linked-immunoassay and comparison of the assay with infant mouse and DNA probe tests. J. Clin. Microbiol. 27, 1697-1699.
6. Gomes, T. A. T., Toledo, M. R. T., Trabulsi, L. R., Wood, P., Morris, J. C. (1987) DNA probes for identification of enteroinvasive *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 25, 2025-2027.
7. Sommerfelt, H., Bhan, M., Brahmattattan, K. N., Srivastava, R., Suresh, M., Bjorvatn, B. (1989) Oligonucleotide gene probes may detect enterotoxigenic *Escherichia coli* directly in fecal smears. APMIS 97, 91-94.
8. Moseley, S. L., Echeverria, J., Seriwatana, C., Tirapat, W., Chaicumpa, T., Falkow, S. (1982) Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* by colony hybridization using three enterotoxin gene probes. J. Infect. Dis. 145, 863-869.
9. Nishibuchi, M., Arita, M., Honda, T., Miwatani, T. (1988) Evaluation of a nonisotopically labeled oligonucleotide probe to detect the heat-stable enterotoxin gene of *Escherichia coli* by the DNA colony hybridization test. J. Clin. Microbiol. 26, 784-786.
10. Candarin, U., Furrer, B., Höflein, C., Meyer, R., Jermini, M., Lüthy, J. (1991) Detection of *Escherichia coli* and identification of enterotoxigenic strains by primer-directed enzymatic amplification of specific DNA sequences. Intern. J. Food Microbiol. 12, 339-352.
11. Pollard, D. R., Johnson, W. M., Lior, H., Tyler, S. D., Rozee, K. R. (1990) Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 28, 540-545.
12. Lortie, L. A., Dubreuil, J., Harel, J. (1991) Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. J. Clin. Microbiol. 29, 656-659.
13. Wenars, K., Delfgou, E., Soentoro, P. S., Notermans, S. (1991) Successful approach for detection of low numbers of enterotoxigenic *Escherichia coli* in minced meat by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1914-1919.
14. Pollard, D. R., Johnson, W. H., Lior, H., Tyler, S. D., Rozee, K. R. (1990) Differentiation of Shiga toxin and verocytotoxin type 1 genes by polymerase chain reaction. J. Infect. Dis. 162, 1195-1198.
15. Notermans, S., Wernars, K., Soentoro, P. S., Dufrenne, J., Jansen, W. (1991) DNA hybridization and latex agglutination for detection of heat-labile- and Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in meat. Intern. J. Food Microbiol. 13, 31-40.
16. Medon, P. P., Lanser, J. A., Monckton, P. R., Li, P., Symonds, R. H. (1988) Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates with enzyme-labeled synthetic oligonucleotide probes. J. Clin. Microbiol. 26, 2173-2176.
17. Jackson, M. P., Neill, R. J., O'Brien, A. D., Holmes, R. K., Newland, J. W. (1987) Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. FEMS Microbiol. Lett. 44, 109-114.
18. Calderwood, S., Auclair, F., Donohue-Rolfe, A., Keusch, G. T., Mekananos, J. J. (1987) Nucleotide sequence of Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4364-4368.
19. Yamamoto, T., Yokota, T. (1983) Sequence of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* pathogenic for humans. J. Bacteriol. 155, 728-733.
20. Guzman-Verduzco, L. M., Kupersztoch, Y. M. (1989) Rectification of two *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin allele sequences and lack of biological effect of changing the carboxyterminal tyrosine to histidine. Infect. Immun. 57, 645-648.
21. Scotland, S. M. (1988) Toxins. J. Appl. Bact. Symp. Suppl. 109-129.
22. Karch, H., Meyer, T. (1989) Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27, 2751-2757.
23. Karch, H., Meyer, T., Rüssmann, H., Heesemann, J. (1992) Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. Infect. Immun. 60, 3464-3467.
24. Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. (1990) PCR Protocols. A guide to methods and applications. Academic Press, Inc., San Diego, California.
25. Nishibuchi, M., Murakami, A., Arita, M., Jikuya, H., Takano, J., Honda, T., Miwatani, T. (1989) Detection with synthetic oligonucleotide probes of nucleotide sequence variations in the genes encoding enterotoxins of *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 27, 2272-2276.
26. Victor, T., Toit, R., van Zyl, J., Bester, J. A., van Helden, P. D. (1991) Improved methods for routine identification of toxigenic *Escherichia coli* by DNA amplification of a conserved region of the heat-labile toxin A subunit. J. Clin. Microbiol. 29, 158-161.
27. Woodward, M. J., Wray, C. (1990) Nine DNA probes for detection of toxin and adhesin genes in *Escherichia coli* isolated from diarrhoeal disease in animals. Vet. Microbiol. 25, 55-65.
28. Newland, J. W., Neill, R. J. (1988) DNA probes for Shiga-like toxins I and II and for toxin-converting bacteriophage. J. Clin. Microbiol. 26, 1292-1297.
29. Schmitz, G. G., Walter, T., Seibl, R., Kessler, C. (1991) Nonradioactive labeling of oligonucleotides in vitro with the hapten digoxigenin by tailing with terminal transferase. Anal. Biochem. 192, 222-231.
30. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
31. Bialkowska-Hobrzanska, H. (1987) Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by dot-blot hybridization with biotinylated DNA probes. J. Clin. Microbiol. 25, 338-343.
32. Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132, 6-13.
33. Guth, B. E., Pickett, C. L., Twiddy, E. M., Holmes, R. K., Gomes, T. A. T., Lima, A. A. M., Guerrant, R. L., Franco, B. D. G. M., Trabulsi, L. R. (1986) Production of type II heat-labile enterotoxin by *Escherichia coli* isolated from food and human feces. Infect. Immun. 59, 587-589.
34. Pickett, C. L., Weinstein, D. L., Holmes, R. K. (1987) Genetics of a type Ila heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: operon fusions, nucleotide sequence, and hybridization studies. J. Bacteriol. 169, 5180-5187.
35. Fairbrother, J. M., Broes, A., Jaques, M., Larivière (1989) Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K₁V165⁺ strains isolated from piglets with diarrhea. Am. J. Vet. Res. 50, 1029-1036.
36. Picken, R. N., Mazaitis, A. J., Maas, W. K., Rey, M., Heyneker, H. (1983) Nucleotide sequence of the gene for heat-stable enterotoxin II of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 42, 269-275.
37. Candarin, U., Furrer, B., Höflein, C., Lüthy, J. (1991) Use of inosine-containing oligonucleotide-primers for enzymatic amplification of different alleles of the gene coding for heat-stable toxin type I of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 57, 955-961.
38. Olive, D. M. (1989) Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. J. Clin. Microbiol. 27, 261-265.
39. Moser, D. R., Kirchloff, L. D., Donelson, J. E. (1989) Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using a polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27, 1477-1482.
40. Schütz, B., Hack, B., Keiner, K., Zimmermann, K., Rusch, V. (1993) Detection and differentiation of the toxin genes LT1, ST1a, ST1b, VT1 and VTII in *Escherichia coli* pathotypes by a multiprimer nested PCR. Appl. Microbiol. Biotechnol. im Druck.

Anschrift der Verfasser:

B. Schütz, V. Rusch
 Institut für Mikroökologie
 Kornmarkt 34
 35745 Herborn