

Flüssige Vorkultur von Stuhlproben verbessert den EHEC-Toxinnachweis mit ELISA und Zytotoxizitätstest

Liquid Cultural Enrichment of Stool Enhances the Detection of EHEC Toxins with Both ELISA and Cytotoxicity Assay

A. Gerritzen^{1,2}, B. Hövener¹, C. Cornely¹

Zusammenfassung: Der Nachweis der Shigatoxine im Patientenstuhl ist unverzichtbarer Bestandteil der Diagnostik von Infektionen mit Enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). Wir untersuchten den Einfluß einer vorherigen, 18-stündigen kulturellen Anreicherung von Stuhlproben in Tryptone Soya Bouillon auf die Toxin-Nachweisraten mit einem Enzymimmunoassay (ProSpecT[®] Shiga-Like Toxins I and II Microplate Assay; Alexon, USA; Vertrieb in Deutschland: Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim) und dem Zytotoxizitätstest auf Verozellen. Hierfür wurden dreißig Stuhlproben von vierzehn Patienten verwendet, in denen eine EHEC-Infektion durch Erregerisolierung nachgewiesen werden konnte (je vier Fälle mit EHEC O:157 und O:26, je einer mit O:91, O:111, O:128, O:166, zweimal serologisch nicht typisierbare EHEC-Stämme). Der Zytotoxizitätstest reagierte bei allen 30 Stuhlanreicherungskulturen mit dem für Shigatoxine typischen, zytopathischen Effekt (Sensitivität: 100%). Der Enzymimmunttest war in 22 dieser Proben (73,3%) positiv. Wurden dagegen nicht vorkultivierte Stuhlproben eingesetzt, konnten mit der Zellkultur nur zehnmal (33,3%), mit dem Enzymimmunttest sogar nur neunmal (30,0%) Shigatoxine nachgewiesen werden. Gerade bei Verdacht auf eine EHEC-Infektion ist zwar eine schnelle Diagnostik wünschenswert, doch wäre bei Verzicht auf eine Vorkultur nur jede dritte der EHEC enthaltenden Stuhlproben erfaßt worden. Dies ist bei einer potentiell lebensbedrohlichen Infektionskrankheit nicht zu tolerieren.

Schlüsselwörter: *Escherichia coli*-Infektionen, Stuhl/Mikrobiologie; Enterotoxine/Analytik; ELISA.

Summary: The detection of shiga toxins in stool specimens is an indispensable part of the diagnosis of infections with enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). We investigated the influence of an 18 hour

cultural enrichment of stools in tryptone soya broth on the subsequent toxin detection rates with both enzyme immunoassay (ProSpecT[™] Shiga-Like Toxins I and II Microplate Assay; Alexon, USA; German distributor: Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim) and the cytotoxicity assay on verocells. Thirty specimens from 14 patients were available, in which EHEC infection was confirmed by isolation (four cases each with EHEC O157 and O26, one with O91, O111, O128, O166, respectively; two with untypeable strains). After culturing the stool specimens for 18 hours in enrichment broth, all samples showed the cytopathic effect typical of shiga toxins (sensitivity: 100%) in the cytotoxicity assay. The enzyme immunoassay was positive in 22 of these specimens (73.3%). In contrast, in the stools tested without cultural enrichment, only 10 (33.3%) were positive in the cell culture test and 9 (30.0%) in enzyme immunoassay. Obviously, when EHEC infections are suspected, a rapid diagnosis is necessary. However, by omitting cultural enrichment, only one out of three stools containing EHEC would have been detected. This is unacceptable in a potentially life-threatening disease.

Keywords: *Escherichia coli* Infections/diagnosis; Feces/microbiology; Enterotoxins/analysis; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

Enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) sind weltweit verbreitete Erreger intestinaler und systemischer Erkrankungen des Menschen. Das klinische Spektrum reicht vom symptomlosen Keimträger über harmlosen Durchfall, blutige Diarrhoe mit kolikartigen Beschwerden, Hämorrhagische Colitis (HC), bis hin zu intravasaler Hämolyse, Thrombotisch-Thrombozytopenischer Purpura (TTP) und dem Hämolytisch-Urämischen Syndrom (HUS) [1, 2, 3]. Der wichtigste, allen EHEC-Stämmen gemeinsame Pathogenitätsfaktor scheint die Bildung eines Zytotoxins zu sein, das als Verotoxin (VT) oder Shigatoxin (Stx) (früher: Shiga-like Toxin, slt) bezeichnet wird. Die genetische Information zur Toxinbildung wird durch temperente Bakteriophagen codiert und kann auch auf andere Enterobakterien, nicht nur *E. coli*, übertragen

¹Gemeinschaftspraxis für Labormedizin, Aachen

²Korrespondenzadresse: Dr. med. Andreas Gerritzen, Gemeinschaftspraxis für Labormedizin, Wallstraße 56, D-52064 Aachen. Fax: +49-241-405992

Eingegangen: 30. Oktober 1997/ Angenommen: 30. Dezember 1997

werden [4, 5]. Zur Zeit sind bei humanpathogenen EHEC die Toxintypen I, II und IIc bekannt, wobei dem Typ II die größte pathogene Bedeutung beizukommen scheint [3]. Der Nachweis der Toxine im Stuhl hat sich als unverzichtbarer Bestandteil der Labordiagnostik von EHEC-Infektionen erwiesen, da sämtliche EHEC-Selektivmedien und Antigentests nur eine Teilpopulation der EHEC erfassen (z. B. nur Serotyp O:157 mit dem Antigen-ELISA oder der Immunmagnetischen Separation (IMS), nur Sorbitol-negative Keime auf McConkey-Sorbitol-Medium (SMAC) usw.). Andere, ebenfalls pathogene EHEC-Stämme werden naturgemäß nicht erfasst, wenn sie nicht das entsprechende Merkmal aufweisen [6]. Als Goldstandard für den Toxinnachweis gilt der Zytotoxizitätstest auf Verozell-Monolayerkulturen [7], der aber wegen des relativ großen technischen Aufwandes meist spezialisierten Laboratorien vorbehalten bleibt. In jüngerer Zeit wurden diverse Shigatoxin-Enzymimmunoassays vorgestellt und zum Teil schon im Markt eingeführt [8], die sich durch einfachere Handhabung auszeichnen. Angesichts einer potentiell lebensbedrohlichen Infektionskrankheit kommt einer möglichst zeitsparenden, einfachen und doch zuverlässigen Diagnostik große Bedeutung zu. In unserer Studie gingen wir deshalb systematisch der Frage nach, ob der Nachweis von EHEC-Toxinen durch direkte Stuhluntersuchungen gewährleistet werden kann oder aber einer zeit- und kostenaufwendigeren, kulturellen Voranreicherung der Stuhlproben bedarf.

Material und Methoden

Stuhlproben

30 Stuhlproben von 14 Patienten wurden für die aktuellen Untersuchungen eingesetzt. In ihnen waren im Zeitraum von Dezember 1996 bis Oktober 1997 in der laufenden Diagnostik des Gemeinschaftslabors EHEC-Bakterien isoliert worden. Die Proben wurden sofort nach Eingang bearbeitet und für spätere Analysen bei -18 °C eingefroren.

Nativ- und Anreicherungsbouillon

Die Stuhlproben wurden vorab mit einem Spatel gründlich homogenisiert. Für den Toxinnachweis aus nativem Stuhlmaterial wurde eine ca. erbsgroße Portion in 1 ml Tryptone Soya Bouillon (TSB, Oxoid, Wesel) suspendiert (Verdünnung ca. 1:10) und sofort, ohne weitere Vorbebrütung, weiterverarbeitet. Eine zweite Portion wurde zur kulturellen Anreicherung

enthaltener EHEC-Bakterien in 3 ml TSB suspendiert und anschließend über Nacht stationär bei 35 °C bebrütet. Ausführliche Vorversuche (nicht dargestellt) hatten gezeigt, daß diese Bebrütungstemperatur im Vergleich zu einer 37 °C-Kultur keinen negativen Einfluß auf den Toxinnachweis hat.

Shigatoxin-Nachweis

Als Shigatoxin-ELISA wurde der ProSpecT® Shiga-Like Toxins I and II Microplate Assay (Alexon, USA; Vertrieb in Deutschland: Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim) verwendet. Für die Untersuchungen aus angereichertem Material wurden 300 µl der vorbebrüteten Bouillons 1:2 mit dem mitgelieferten Probenverdünnungspuffer vermischt. Hiervon wurde ein 200 µl-Aliquot unter genauer Beachtung der Hersteller-/Vertriebsangaben im Enzymimmunoassay eingesetzt. Die entsprechenden Untersuchungen aus Nativmaterial erfolgten in analoger Weise aus den nicht vorbebrüteten Bouillons. Der Zytotoxizitätstest (Nativansatz) wurde im Mikrotiterverfahren mit durch Zentrifugation für eine Stunde bei 12 000 g gereinigtem Überstand der jeweiligen TSB-Bouillons vorgenommen. Da bei den Anreicherungskulturen ein größeres Probenvolumen vorlag, konnten diese durch Sterilfiltration für den Zellkulturtest vorbereitet werden. Ein Einfluß der unterschiedlichen Präparationsweisen auf den Toxinnachweis wurde in Vorversuchen ausgeschlossen. Je 1 und 10 µl des gereinigten Überstandes der jeweiligen TSB-Bouillons wurden zu je 100 µl Zellkulturmedium (EMEM Serva, Heidelberg) mit Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (Boehringer Mannheim) direkt in die Mikrotiter-Kavitäten auf zwei Tage alte Verozell-Monolayer pipettiert. Nach 20-stündiger Bebrütung bei 37 °C und 5% CO₂ wurden die Kulturen mikroskopisch auf die Ausbildung des für Shigatoxine charakteristischen zytopathischen Effekts untersucht. Eine längere Beobachtungsdauer der Ansätze führte zu keiner höheren Nachweisrate.

Isolierung und Typisierung von EHEC-Stämmen

Die TSB-Anreicherungsbouillons aller 30 Proben wurden nach Bebrütung auf Enterohämolsinagar (Oxoid, Wesel) ausgestrichen. Verdächtige Kolonien wurden auf einer neuen Platte mit Enterohämolsinagar subkultiviert und in Reinkultur in frischer TSB angezüchtet. Es folgte die Überprüfung auf Toxinbildung mit dem Zytotoxizitätstest und im Enzymimmunoassay. Anschließend wurde der Serotyp mit poly- und monovalenten Antiseren (Sifin, Berlin) bestimmt. Serotypen, die mit den kommerziell verfügbaren Antiseren nicht identifiziert werden konnten, wurden durch PD Dr. L. Beutin, Robert Koch Institut, Fachbereich für Enterobacteriaceen und pathogene *E. coli* in Berlin typisiert. Die Ausstattung mit den Genen für die Shigatoxine Typ I und II / IIc sowie eaeA (Intimin/Adhäsion) wurde mit Hilfe der PCR [9] überprüft. Der Nachweis der Enterohämolsinbildung [10] erfolgte phänotypisch mit Reinkulturen auf den entsprechenden Spezial-Agarplatten.

Nicht standardisierte Abkürzungen: eaeA, *Escherichia coli* attaching and effacing-Gen (Intimin/Adhäsion); EHEC, enterohämorrhagische *Escherichia coli*; E-Hly, Enterohämolsin; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; HUS, hämolytisch-urämisches Syndrom; PCR, polymerase chain reaction; TSB, tryptone soya bouillon; TTP, thrombotisch-thrombozytopenische Purpura; VTEC, Verotoxin bildende *Escherichia coli*.

Ergebnisse

Im Rahmen der laufenden Diagnostik des Gemeinschaftslabors wurden mit dem Zytotoxizitätstest aus angereicherten TSB-Kulturen Shigatoxine in den dreißig vorliegenden Stuhlproben von insgesamt 14 Patienten nachgewiesen. In allen Fällen konnten nach Ausstreichen der Bouillon auf Enterohämolysin-Agar EHEC-Bakterien isoliert werden, die sich auch in Reinkultur als verotoxisch erwiesen. Auch der Enzymimmunttest detektierte in allen TSB-Reinkulturen die Shigatoxine, wenn auch in einigen Proben erst nach 48-stündiger Kulturdauer (nicht dargestellt). Die anschließende Charakterisierung der Erreger ergab je vier infizierte Patienten mit EHEC Typ O:157 und Typ O:26, und je einmal die Typen O:91, O:111, O:128 und O:166. Die Isolate zweier Patienten konnten nicht serologisch typisiert werden und wurden dementspre-

chend als O:NT (nicht typisierbar) bezeichnet. Die PCR-Untersuchungen zeigten, daß die EHEC von sieben Patienten die genetische Information für Shigatoxin Typ I besaßen, vier Fälle waren mit Typ II assoziiert. Bei drei Fällen wurde das gleichzeitige Vorliegen von Shigatoxin Typ I- und Typ II-Genen nachgewiesen. Das eaeA-Gen, welches für einen weiteren wichtigen Pathogenitätsfaktor der EHEC, das Intimin/Adhäsion codiert, wurde mit einer Ausnahme bei Stämmen aller Patienten nachgewiesen. Alle Isolate zeigten den enterohämolytischen Phänotyp (vgl. Tabelle 1).

Bis zur Aufnahme der aktuellen, vergleichenden Untersuchungen zum Shigatoxinnachweis waren alle Stuhlproben zwischenzeitlich bei -18 °C eingefroren gelagert worden. Aus den nun erneut frisch angelegten Anreicherungskulturen in TSB waren mit dem Zytotoxizitätstest wiederum in allen dreißig Proben Shigatoxine nachweisbar (Sensitivität: 100%). Der Toxin-

Tabelle 1 Vergleichender Shigatoxin-Nachweis aus nativen und in TSB-Bouillon vorkultierten Stuhlproben EHEC-infizierter Patienten mittels Enzymimmunoassay und Zytotoxizitätstest auf Verotoxinen

Fall/Probe	Isolierter EHEC Typ	Stx	eaeA	E-Hly	Zytotoxizitätstest nativ	Zytotoxizitätstest vorkultiert	Enzymimmunttest nativ	Enzymimmunttest vorkultiert	Abstand (Tage) zur Vorprobe bei Verlaufskontrollen
1 / 1	157	I+II	+	+	+	+	+	+	
2 / 1	157	II	+	+	+	+	+	+	
3 / 1	26	II	+	+	+	+	+	+	
3 / 2	26	II	+	+	-	+	-	-	9
3 / 3	26	II	+	+	-	+	-	+	14
4 / 1	26	I+II	+	+	+	+	+	+	
5 / 1	26	I	+	+	+	+	+	+	
6 / 1	NT	I	+	+	-	+	-	+	
7 / 1	91	I	+	+	-	+	-	+	
8 / 1	128	I	-	+	-	+	-	+	
9 / 1	NT	II	+	+	+	+	-	+	
9 / 2	n.d.	II	+	+	-	+	-	-	10
10 / 1	26	I	+	+	+	+	+	+	
11 / 1	111	I	+	+	+	+	+	+	
12 / 1	166	I	+	+	-	+	-	+	
12 / 2	n.d.	I	+	+	-	+	-	+	1
12 / 3	n.d.	I	+	+	-	+	-	+	7
12 / 4	n.d.	I	+	+	-	+	-	+	1
12 / 5	n.d.	I	+	+	-	+	-	+	1
12 / 6	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	+	-	-	6
12 / 7	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	+	-	-	1
12 / 8	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	+	-	+	1
12 / 9	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	+	-	+	6
12 / 10	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	+	-	+	1
12 / 11	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	+	-	-	1
12 / 12	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	+	-	-	8
12 / 13	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	+	-	-	1
12 / 14	n.d.	n.d.	n.d.	+	-	+	-	-	1
13 / 1	157	II	+	+	+	+	+	+	
14 / 1	157	I+II	+	+	+	+	+	+	

NT nicht typisierbar
n.d. nicht durchgeführt (Verlaufskontrolle bei bekannter Infektion)
Stx Shigatoxin
eaeA *E. coli* attaching and effacing-Gen (Intimin/Adhäsion)
E-Hly Enterohämolysin

ELISA zeigte nur in 22 der Proben ein Ergebnis oberhalb des Cutoff-Wertes an (73,3%). Alle acht falsch negativen ELISA-Ergebnisse wurden mit Stuhlproben erzielt, die Verlaufskontrollen im Rahmen einer bereits in einer früheren Probe diagnostizierten EHEC-Infektion darstellten. Die jeweils erste Probe eines Patienten wurde übereinstimmend durch beide Testverfahren richtig positiv detektiert.

Wesentlich niedriger war die Nachweisrate der Shigatoxine mit beiden Methoden bei Untersuchungen, die aus nicht vorher kulturell angereichertem Material vorgenommen wurden. Mit dem Zytotoxizitätstest wurden im Nativmaterial nur zehn der dreißig Proben (33,3%) richtig als positiv erkannt. Sie stammten von zehn der 14 Patienten. Der ELISA zeigte sogar nur neun von dreißig Proben (30,0%) richtig positiv an, die ebenfalls alle von verschiedenen Patienten stammten. Alle ELISA-positiven Proben waren auch im Zellkulturtest verotoxisch. Die Ergebnisse der Untersuchungen im einzelnen sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Diskussion

Eine potentiell lebensbedrohliche Erkrankung, wie sie mit Infektionen durch EHEC-Bakterien assoziiert sein kann, verlangt nach einer möglichst schnellen und doch suffizienten Diagnostik. Im Laboralltag sind darüber hinaus Verfahren von Vorteil, die den erforderlichen Zeit- und Kostenaufwand in einem vertretbaren Rahmen halten. Der Nachweis von Shigatoxinen im Stuhl wird deshalb heute in vielen Laboratorien in erster Linie mit ELISA-Tests vorgenommen. Zeit und Aufwand hierfür könnten besonders gering gehalten werden, wenn der Nachweis schon aus nativen Stuhlsuspensionen ohne kulturelle Vorbebrütung erfolgreich durchführbar wäre. Leider weisen unsere Ergebnisse in eine andere Richtung.

In einer früheren Untersuchung [8] hatten wir bereits im Rahmen einer prospektiven Studie mit 431 Kinderstühlen den Verdacht begründet, daß Toxin-ELISAs aus nativem Stuhl-Material dem Zytotoxizitätstest aus vorbebrüteten Stuhlkulturen unterlegen sind. Der Premier® EHEC ELISA (HISS Diagnostics, Freiburg) zeigte nur in 30% der Stuhlproben das Vorliegen von Shigatoxinen an, bei denen der Zytotoxizitätstest den typischen zytopathischen Effekt aufwies und aus denen EHEC-Bakterien nachgewiesen werden konnten. Auch die Vorläuferversion des in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Shigatoxin-ELISA (Alexon / Virotech) hatte nur 40% der EHEC-positiven Stuhlproben erfaßt (Differenz zwischen beiden eingesetzten ELISA-Tests nicht signifikant).

In der hier vorliegenden Studie gingen wir deshalb systematisch der Frage nach, welchen Einfluß eine kulturelle Voranreicherung von Stuhlproben auf den Shigatoxin-Nachweis mit ELISA und Zytotoxizitätstest hat. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen brachten eine weitere Bestätigung unseres Verdachtes.

Das von uns routinemäßig durchgeführte Verfahren, nämlich der Zytotoxizitätstest aus über Nacht vorkultierten TSB-Bouillons, detektierte aus frischem wie eingefrorenen Stuhlmaterial alle dreißig EHEC-haltigen Proben richtig. Ein negativer Einfluß der zwischenzeitlichen Aufbewahrung von Stuhlproben bei -18 °C auf die Toxin-Nachweisrate war im Zellkulturtest nicht erkennbar. Demgegenüber fiel der ELISA aus demselben, angereicherten Material nur 22 mal positiv aus, wobei sich die falsch negativen Ergebnisse auf Verlaufskontrollen zuvor erkannter EHEC-Infektionen beschränkten.

Daß keine von beiden Methoden eine ausreichende Empfindlichkeit für die ausschließliche Untersuchung von Nativmaterial aufweist, belegen die entsprechenden Daten: 33,3% Sensitivität für den Zellkulturtest und 30,0% für den Shigatoxin-ELISA verbieten einen alleinigen Einsatz ohne zusätzliche Voranreicherung. Negative Ergebnisse sollten immer durch entsprechende Untersuchungen aus vorangereichertem Material überprüft werden. In völliger Übereinstimmung mit diesen Befunden steht die jüngst veröffentlichte Empfehlung der deutschen Fachgesellschaften zur EHEC-Diagnostik [11]. Der Arbeitskreis VTEC/EHEC des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV), des Robert Koch Instituts (RKI) und der Fachgruppe „Gastrointestinale Infektionen“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) gibt sowohl für den Toxin-ELISA, als auch für die PCR die Verwendung vorangereicherter Materials definitiv vor. Lediglich für den Zytotoxizitätstest wird auch die Verwendung von nativen Stuhlsuspensionen freigestellt. Den diagnostischen Nutzen der Voranreicherung hoben auch *Frias et al.* [12] hervor. Sie verzeichneten in einer klinischen Evaluation des Premier® EHEC ELISA (HISS Diagnostics, Freiburg), daß artefiziell mit EHEC versetzte Stuhlproben 1000-fach höhere Bakterienkonzentrationen aufweisen mußten, damit die Toxine mit dem Enzymimmuntest aus nativem statt aus angereichertem Stuhlmaterial nachgewiesen werden konnten.

Nicht überraschend war die etwas höhere Sensitivität des Zytotoxizitätstests gegenüber dem ELISA [1, 13]. Sie zeigte sich bei nativen und kulturell angereicherten Stuhlproben, wie auch bei der Untersuchung von EHEC-Isolaten in TSB-Reinkulturen (nicht dargestellt). Zwar führte sie in den vorliegenden Untersuchungen nicht zum Erkennen zusätzlicher EHEC-Patienten, da aus den Anreicherungsbouillons die jeweils erste Probe eines Patienten auch mit dem ELISA richtig detektiert wurde. Es sei aber in Erinnerung gerufen, daß gerade Patienten mit schweren extraintestinalen Komplikationen oft nur (noch) sehr geringe EHEC-Keimzahlen im Stuhl aufweisen [14, 15], so daß gerade hier die höchstmögliche Sensitivität des Nachweisverfahrens erforderlich erscheint. Empfehlenswert wäre daher, das empfindlichere Verfahren aus vorangereichertem Material durchzuführen. Kann statt des Zytotoxizitätstests nur der ELISA eingesetzt werden,

ist die vorherige kulturelle Anreicherung der Stuhlproben umso wichtiger. Die Rezeptur der zu verwendenden Anreicherungsbouillons, eventuelle Zugabe diverser Antibiotika zur Unterdrückung der Begleitflora, sowie besondere Zusätze oder spezielle Kulturbedingungen zur Induktion der Toxinbildung der in einer Probe enthaltenen EHEC sind dabei zur Zeit Gegenstand intensiver Forschungen [16, 17]. Hierbei ist aber auch größtes Augenmerk darauf zu richten, daß Selektivzusätze nicht auch das Wachstum der Zielkeime unterdrücken [18] oder die Freisetzung der Toxine aus den Bakterienzellen behindern [19]. Bislang hat sich in unseren Händen die Verwendung der nicht modifizierten Tryptone Soja Bouillon bewährt.

Danksagung

Wir danken Frau Dipl.-Biol. *Gabi Schulte* (Aachen) und PD Dr. *L. Beutin* (RKI, Berlin) für hilfreiche Diskussionen. *Brigitte Hradek* und *Sabine Heinrichs* sei Dank und Anerkennung für exzellente technische Assistenz bei der Durchführung der Tests ausgesprochen. Dank auch an die Firmen Genzyme Virotech GmbH, Rüsselsheim, und Oxoid, Wesel, für die kostenlose Lieferung des Toxin-ELISA bzw. der Enterohämolyseplatten.

Literatur

1. Beutin L, Horbach I, Zimmermann S, Gleier K. Vergleich verschiedener diagnostischer Methoden zum Nachweis von Verotoxin (Shiga-Toxin) bildenden *Escherichia coli* Stämmen (VTEC) aus klinischen Stuhlproben. *J Lab Med* 1997; 21:537-46.
2. Beutin L. Infektionen mit enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC). *Bundesgesundhbl* 1996; 39:426-9.
3. Bockemühl J, Karch H, Tschäpe H. Infektionen des Menschen durch enterohämorrhagische *Escherichia coli* (EHEC) in Deutschland, 1996. *Bundesgesundhbl* 1997; 40:194-7.
4. Paton AW, Paton JC. Enterobacter cloacae producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1996; 34:463-5.
5. Schmidt H, Montag M, Bockemühl J, Heesemann J, Karch H. Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect Immun* 1993; 61:534-43.
6. Acheson DWK, Keusch GT. Which Shiga Toxin-Producing Types of *E. coli* are Important? *ASM News* 1996; 62:302-6.
7. Caprioli A, Luzzi I, Gianviti A, Russmann H, Karch H. Phenotyping of verotoxin 2 (VT2)-producing *Escherichia coli* causing haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome by direct analysis of patients' stools. *J Med Microbiol* 1995; 43:348-53.
8. Gerritzen A, Cornely C, Hövener B, Beutin L. EHEC-Diagnostik per ELISA? 48. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 8.-11. Oktober 1996 in Bonn.
9. Russmann H, Schmidt H, Heesemann J, Caprioli A, Karch H. Variants of Shiga-like toxin II constitute a major toxin component in *Escherichia coli* O157 strains from patients with a haemolytic uraemic syndrome. *J Med Microbiol* 1994; 40:338-43.
10. Beutin L, Zimmermann S, Gleier K. Rapid Detection and Isolation of Shiga-Like Toxin (Verocytotoxin)-Producing *Escherichia coli* by Direct Testing of Individual Enterohemolytic Colonies from washed Sheep Blood Agar Plates in the VTEC-RPLA Assay. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2812-4.
11. Bockemühl J, Karch H, Kist M. für den Arbeitskreis VTEC/EHEC des BgVV und des RKI unter Mitarbeit der DGHM-Fachgruppe „Gastrointestinale Infektionen“ Empfehlungen zu Indikationen und Methoden der mikrobiologischen Diagnostik von Infektionen durch EHEC/STEC. *Hygiene und Mikrobiologie* 1997; 3:14-5.
12. Frias C, Majo M, Margall N, Llobet T, Mirelis B, Prats G. Evaluation of an enzyme immunoassay for verotoxin detection in *Escherichia coli*. *Microbiologia* 1996; 12:395-404.
13. Randall LP, Wray C, McLaren IM. Studies on the development and use of a monoclonal sandwich ELISA for the detection of verotoxic *Escherichia coli* in animal faeces. *Vet Rec* 1997; 140:112-5.
14. Tarr PI, Neill MA, Clausen CR, Watkins SL, Christie DL, Hickman RO. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uraemic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. *J Infect Dis* 1990; 162:553-6.
15. Karch H, Janetzki-Mittmann C, Aleksic S, Datz M. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture. *J Clin Microbiol* 1996; 34:516-9.
16. Asai Y, Murase T, Osawa R, Okitsu T, Suzuki R, Sata S, Yamai S, Wada A, Tamura K, Watanabe H. Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (O157:H7) by an immunomagnetic separation method. *Kansenshogaku Zasshi* 1997; 71:46-55.
17. Heuvelink A, Schulten S, Hoenderken R, Bijker P, de Boer E. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Dutch veal calves and beef cattle. *Tijdschr Diergeneeskd* 1996; 121:642-6.
18. Okazaki N, Suzuki R, Sata S, Ohsawa R, Watanabe Y, Yamai S, Wada A, Watanabe H. Studies on enrichment broth for verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O157. *Nippon Saikingaku Zasshi* 1997; 52:505-11.
19. Ito T, Akino E, Hiramatsu K. Evaluation of antibiotics used for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 enteritis - effect of various antibiotics on extracellular release of verotoxin. *Kansenshogaku Zasshi* 1997; 71:130-5.