



Kanton Zürich
Gesundheitsdirektion
Kantonales Labor Zürich

Quantifizierung und Charakterisierung von STEC mittels digitaler PCR

24.03.2022

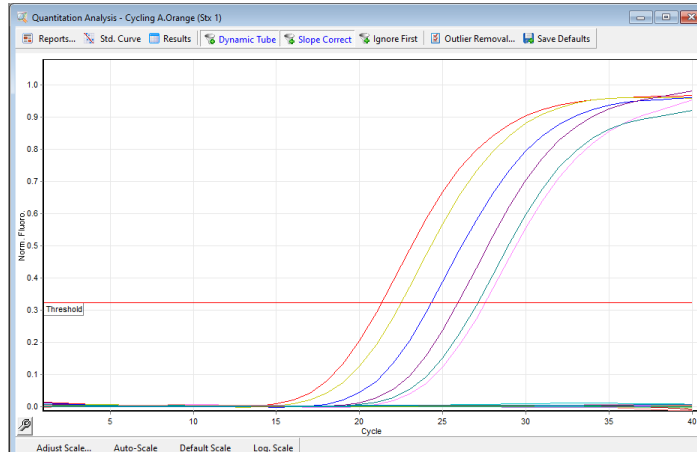
Martin Peier



Inhalt

- I PCR-Screening und Risikoabschätzung**
- II Digitale PCR: der Weg zum STEC-Isolat**
- III Charakterisierung direkt mit dPCR?**
- IV Zusammenfassung und Ausblick**

PCR-Screening und Risikoabschätzung



Level<	Marker	Risikopotential
1	stx2a + eae oder aggR	D/BD/HUS
2	stx2d	D/BD/HUS ¹
3	stx2c+eae	D/BD ²
4	stx1a+eae	D/BD ²
5	andere stx-Subtypen	D [^]

(D) Diarrhoe, (BD) blutige Diarrhoe, (HUS) hämolytisch-urämisches Syndrom

1. Das Potential für HUS hängt von der stx2d Variante und dem Stammhintergrund ab.
2. Einige Subtypen wurden mit BD assoziiert und in seltenen Fällen mit HUS.

Tabelle basiert auf:

Mikrobiologische Risikoevaluation Shigatoxin produzierender E. coli (STEC) in Lebensmitteln <https://www.blv.admin.ch/dam/blv/de/dokumente/lebensmittel-und-ernaehrung/lebensmittelsicherheit/krankheitserreger-und-hygiene/risikoevaluation-stec.pdf.download.pdf>

JEMRA (2018): Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring <http://www.fao.org/3/ca0032en/CA0032EN.pdf>

Auf das PCR-Screening der Anreicherung folgt eine erste Risikobeurteilung

Real-Time PCR-Systeme

AllBaktA (STEC/eae)

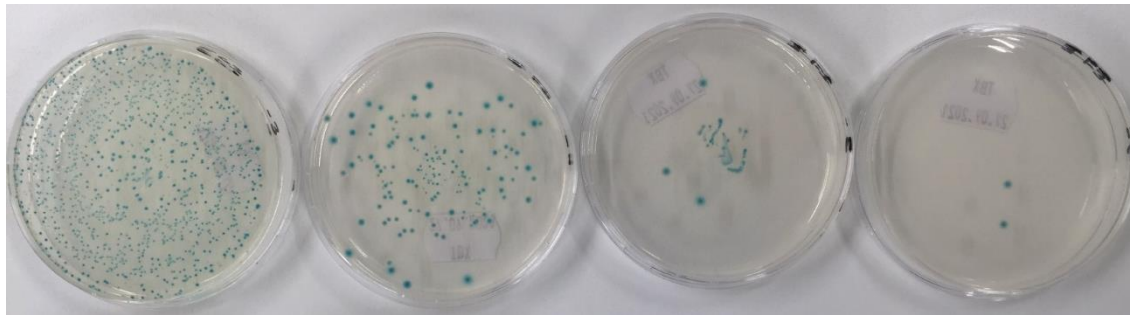
AllColi2 (stx1/stx2/eae)

AllEHEC (O157 usw.)

Beanstandung grundsätzlich nur wenn Keim isoliert vorliegt!



PCR-Screening und Risikoabschätzung



TBX (44°C) ab STEC positiver
Anreicherung

-3

-4

-5

-6

Problem 1 – wie viel Aufwand betreiben?

Wie viel Kolonien müssen wir picken, damit wir stx-positive E. coli erwischen?

Problem 2 – wie gefährlich könnte es wirklich sein?

Stammen die gemessenen Signale vom gleichen Klon?



Digitale PCR: der Weg zum STEC-Isolat

Die digitale PCR soll uns helfen:

1. Eine Minorität zu bestimmen:

**Bestimmung des Anteils von STEC in einer E. coli
Mischkultur in einer Anreicherung**

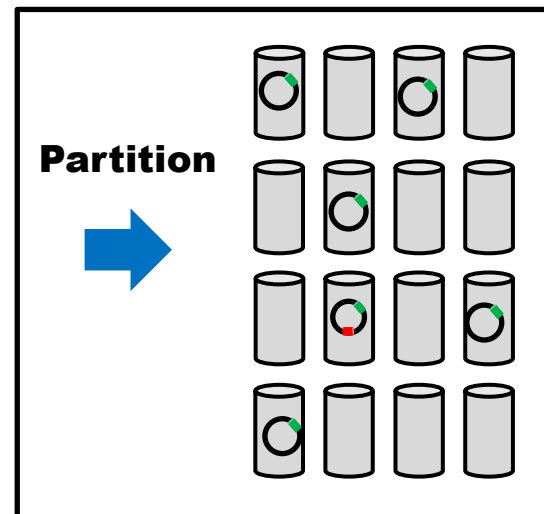
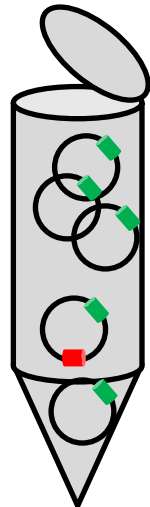
2. Mehrfach positive STEC zu identifizieren:

stx1/eae oder stx1/stx2 oder stx1/stx2/eae

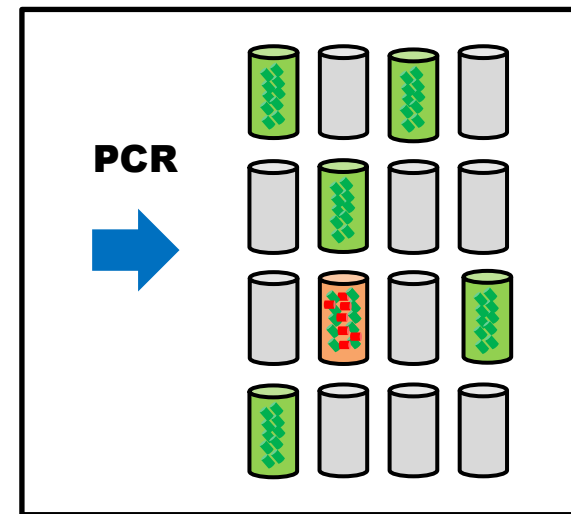


Digitale PCR: der Weg zum STEC-Isolat

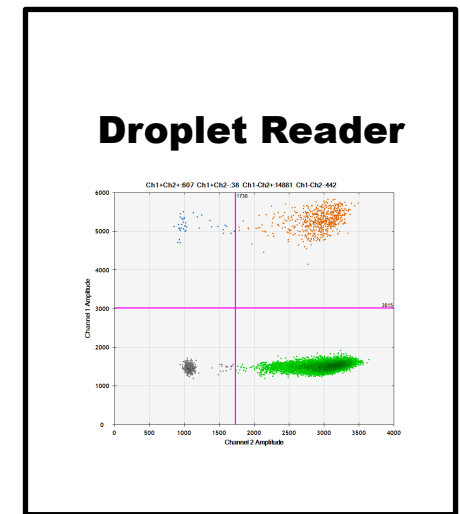
Digitale PCR – das Prinzip:



- 10'000 – 20'000 Droplets
- Wasser in Öl Emulsion



- Endpunkt-PCR in den Droplets
- Absolute Quantifizierung

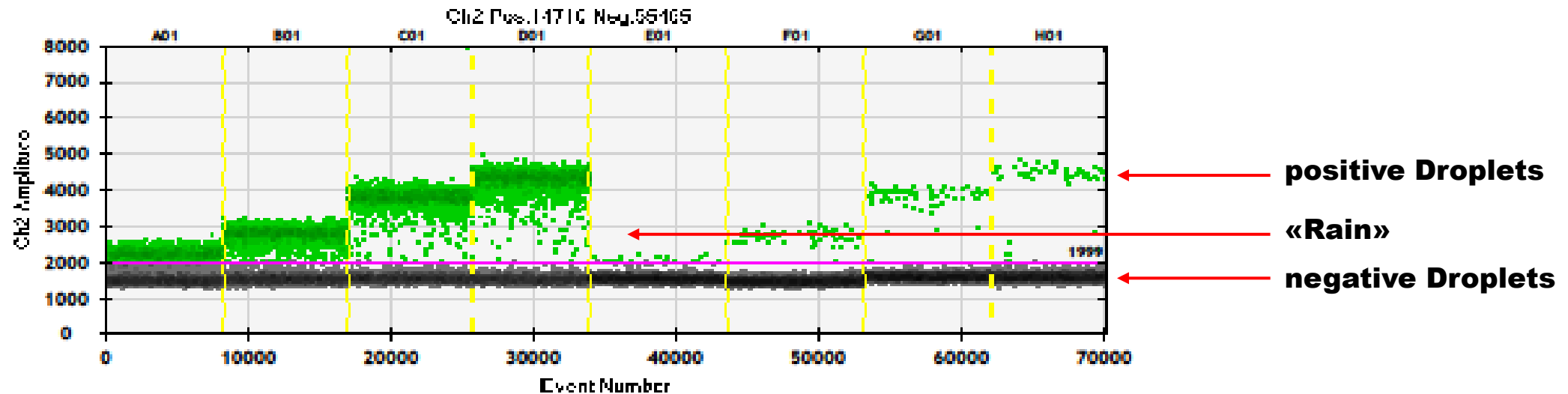


- Auslesen der Droplets
- Berechnung der DNA copy numbers



Digitale PCR: der Weg zum STEC-Isolat

Digitale PCR – Primer-Titration für eae (JOE)



Templat 1:1'000

Primer Zugabe in μl (5 μM)

0.5 1 2 4

Messwert Kopien /ul

488 675 693 776

Templat 1:10'000

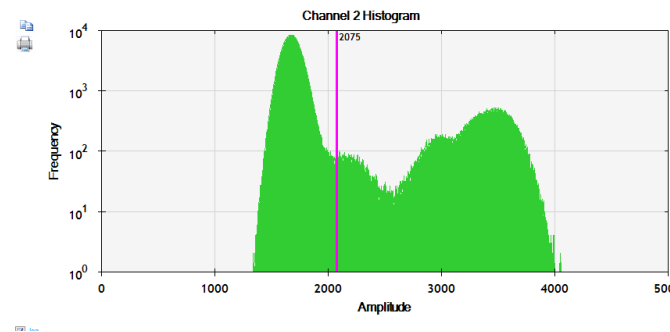
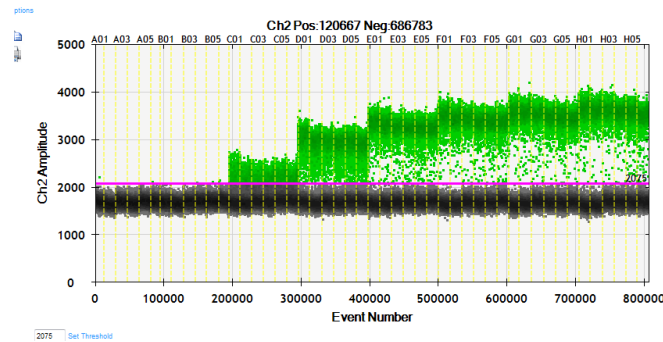
0.5 1 2 4

2.6 7 8.3 8.3



Digitale PCR: der Weg zum STEC-Isolat

Digitale PCR – Optimierung der Annealing-Temperatur



ea (JOE)

Von 64°C (links) bis 56°C (rechts)



Digitale PCR: der Weg zum STEC-Isolat

Mischungsexperiment O26 mit eae mit E. coli

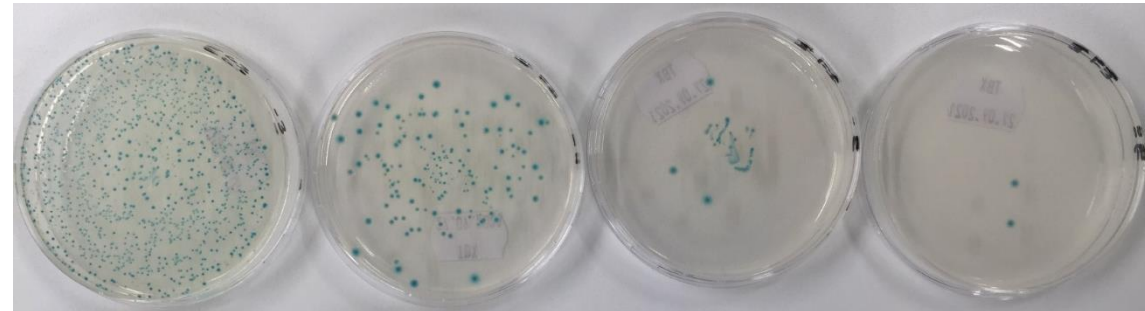
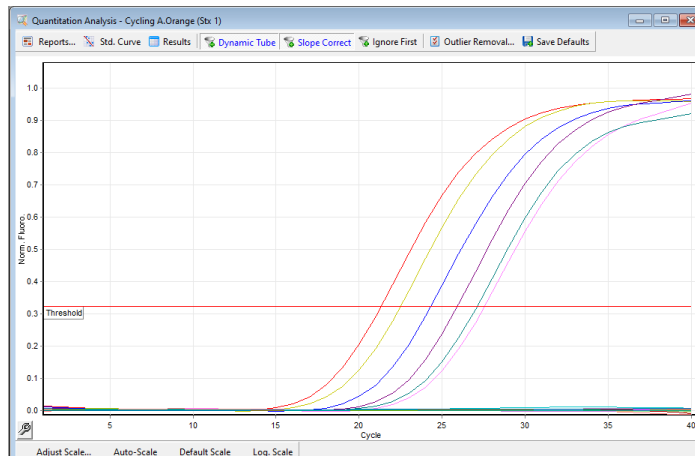
	E. coli [copies/ μ l]	eae [copies/ μ l]	Anteil eae (%)	Anteil eae (%) korrigiert
E. coli 100% 1:100	3'150	-	-	-
O26:H31 100% 1:100	2'510	824	32.83	98.49
O26:H31 32% 1:100	3'030	237	7.82	23.47
O26:H31 10% 1:100	1'968	63	3.20	9.60
O26:H31 3.2% 1:100	3'370	35	1.05	3.15
O26:H31 1% 1:100	3'570	13	0.35	1.06

Das Mischungsexperiment zeigt, dass der eae Anteil im Vergleich zum E. coli Signal unterschätzt (ca. Faktor 3) wird.



Digitale PCR: der Weg zum STEC-Isolat

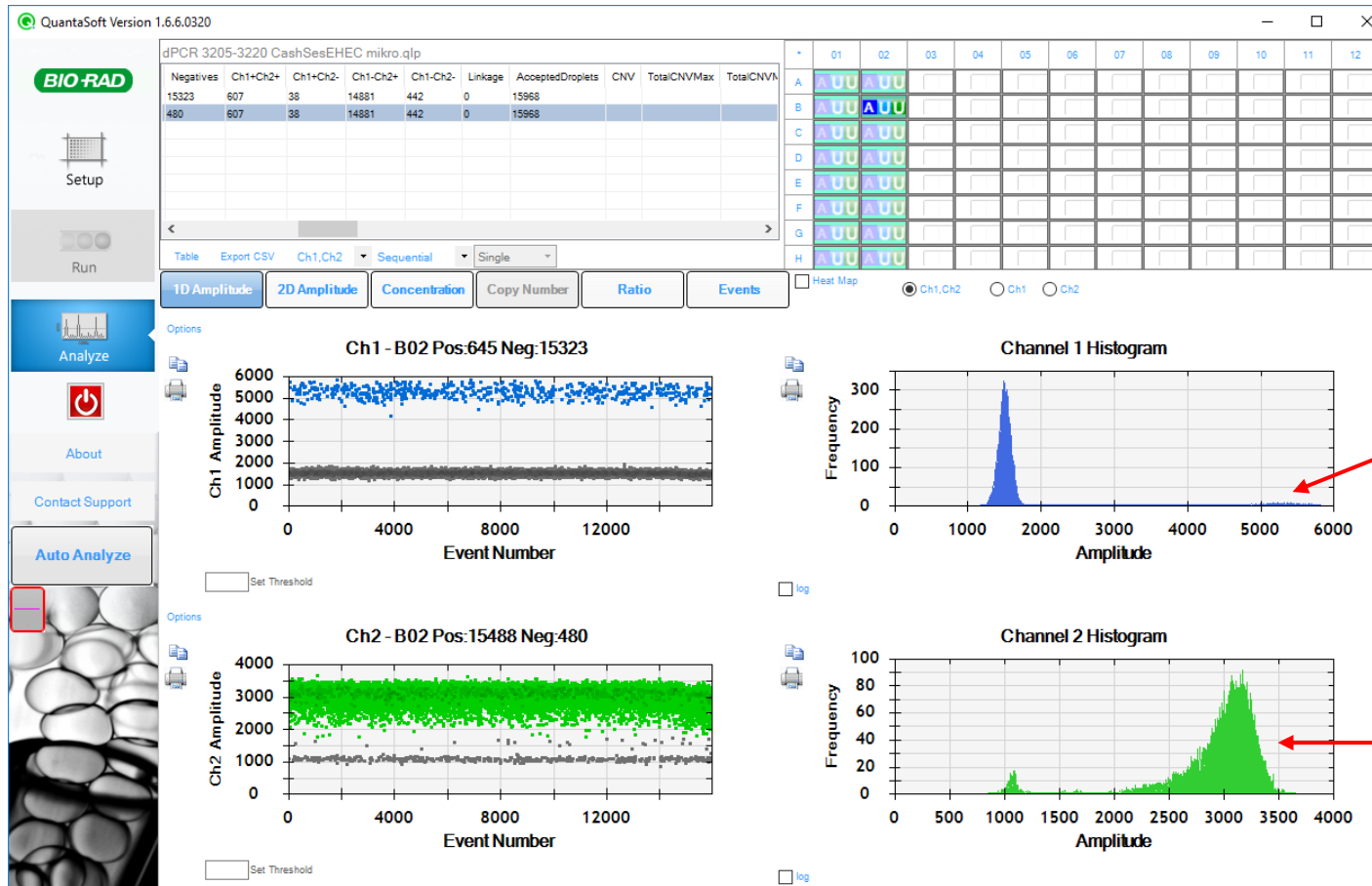
Beispiel thermisierter Weichkäse stx1 positiv im PCR-Screening nach Anreicherung



Frage: Wie gross ist der Anteil an stx1-positiven STEC in der E. coli Population?

Digitale PCR: der Weg zum STEC-Isolat

Beispiel thermisierter Weichkäse stx1 positiv



sxt1 (FAM)

E. coli (JOE)

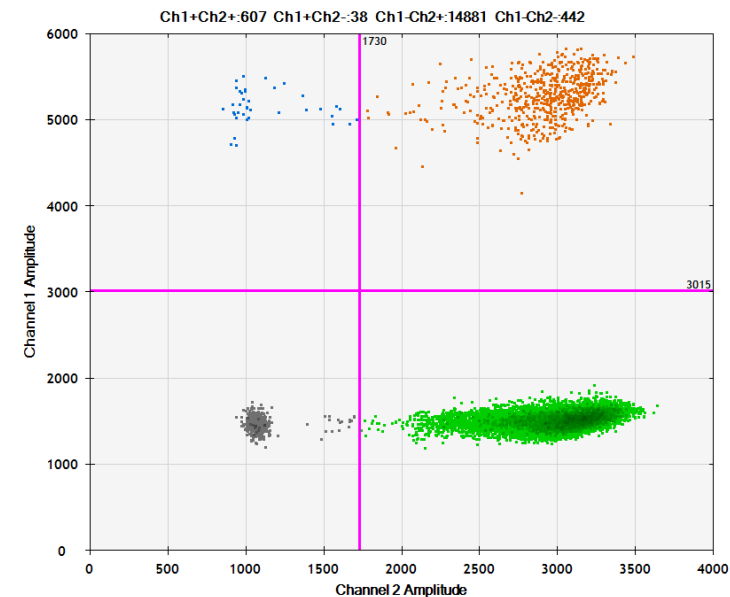


Digitale PCR: der Weg zum STEC-Isolat

Wir messen und rechnen:

Gemessene Zahlen in Events:

Nur stx1-positive Events:	37
Nur E. coli positive Events:	14'881
Doppelt positive Events:	607
Total Droplets:	15'968



Anteil an stx1-positiven STEC

$$\begin{aligned} &= (\text{Doppelt-Positive} / \text{JOE-Positive}) \times 100 \\ &= (607 / 15'488) \times 100 = \mathbf{3.9\%} \end{aligned}$$

Digitale PCR: der Weg zum STEC-Isolat

Wir picken Kolonien

Von 66 Kolonien sind ca. 3 stx1-positive Kolonien zu erwarten



Temperatur-Zeit-Programm		DNV 5 min				Purifizierung / Kriterien	
24°C 5min	95°C 30sec	95°C 30sec	40 Zyklen				Reaktionseffizienz: 0,7
							Run valid/Via: Ja
							Warn: Run in Fail (Nicht weiterarbeiten)
Templ/DNA-Konz.	Lot eintragen	PCR Nr.	E-cof	stx1a	stx2	Aufarbeitung	Bemerkung
1) 100% (unverd.)		17312					Unverdünn
2) 32%		17313					Deckelverd.
3) 10%		17314					Deckelverd.
4) 3,2%		17315					Deckelverd.
5) 1%		17316					Deckelverd.
6) Kolon 1		17317	+	-	-		
7) Kolon 2		17318	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
8) Kolon 3		17319	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
9) Kolon 4		17320	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
10) Kolon 5		17321	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
11) Kolon 6		17322	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
12) Kolon 7		17323	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
13) Kolon 8		17324	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
14) Kolon 9		17325	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
15) Kolon 10		17326	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
16) Kolon 11		17327	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
17) Kolon 12		17328	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
18) Kolon 13		17329	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
19) Kolon 14		17330	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
20) Kolon 15		17331	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
21) Kolon 16		17332	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
22) Kolon 17		17333	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
23) Kolon 18		17334	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
24) Kolon 19		17335	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
25) Kolon 20		17336	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
26) Kolon 21		17337	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
27) Kolon 22		17338	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
28) Kolon 23		17339	+	-	(+)		steht ab Platte in Maseptimix
29) Kolon 24		17340	+	-	(+)		steht ab Platte in Maseptimix
30) Kolon 25		17341	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
31) Kolon 26		17342	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
32) Kolon 27		17343	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
33) Kolon 28		17344	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
34) Kolon 29		17345	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
35) Kolon 30		17346	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
36) Kolon 31		17347	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
37) Kolon 32		17348	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
38) Kolon 33		17349	+	-	(+)		steht ab Platte in Maseptimix
39) Kolon 34		17350	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
40) Kolon 35		17351	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
41) Kolon 36		17352	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
42) Kolon 37		17353	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
43) Kolon 38		17354	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
44) Kolon 39		17355	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
45) Kolon 40		17356	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
46) Kolon 41		17357	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
47) Kolon 42		17358	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
48) Kolon 43		17359	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
49) Kolon 44		17360	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
50) Kolon 45		17361	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
51) Kolon 46		17362	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
52) Kolon 47		17363	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
53) Kolon 48		17364	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
54) Kolon 49		17365	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
55) Kolon 50		17366	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
56) Kolon 51		17367	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
57) Kolon 52		17368	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
58) Kolon 53		17369	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
59) Kolon 54		17370	+	-	(+)		steht ab Platte in Maseptimix
60) Kolon 55		17371	+	-	(+)		steht ab Platte in Maseptimix
61) Kolon 56		17372	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
62) Kolon 57		17373	+	-	(+)		steht ab Platte in Maseptimix
63) Kolon 58		17374	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
64) Kolon 59		17375	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
65) Kolon 60		17376	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
66) Kolon 61		17377	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
67) Kolon 62		17378	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
68) Kolon 63		17379	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
69) Kolon 64		17380	+	-	-		steht ab Platte in Maseptimix
70) Kolon 65		17381	+	-	(+)		steht ab Platte in Maseptimix
71) Kolon 66		17382	+	-	(+)		steht ab Platte in Maseptimix
72) Quer durch die Platte		17383	+	-	(+)		steht ab Platte in Maseptimix
Anzahl Proben:							72



4 Positive erwischt 😊

weitere Charakterisierung:

- STEC mit stx1a jedoch
- eae negativ
- Top-6 negativ

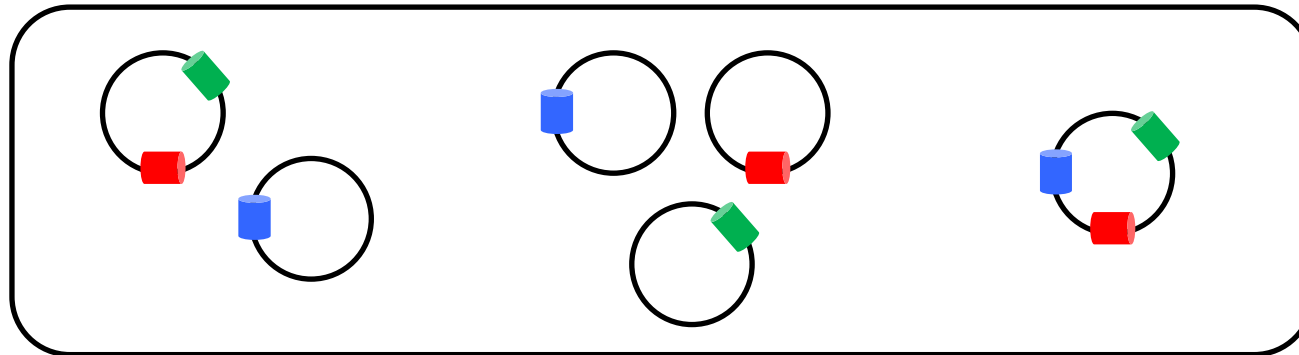




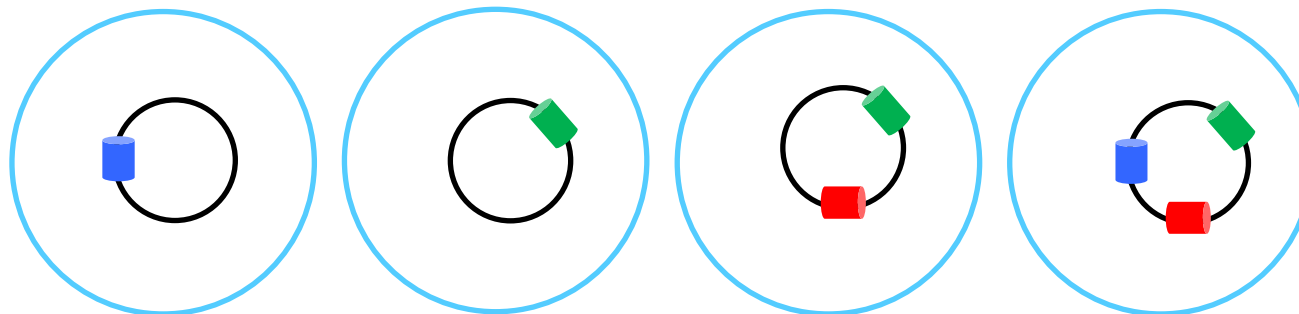
Charakterisierung direkt mit dPCR?

Linkage Assay

Alarm: stx1/stx2/eae-positives Signal!!



RT-PCR

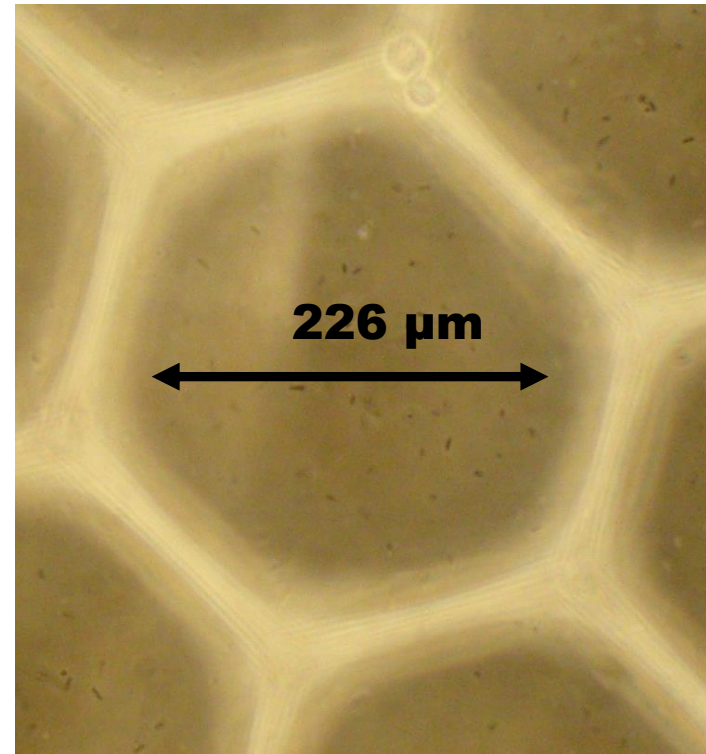
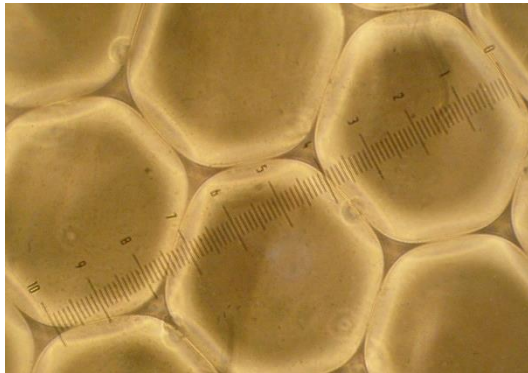


Digitale PCR



Charakterisierung direkt mit dPCR?

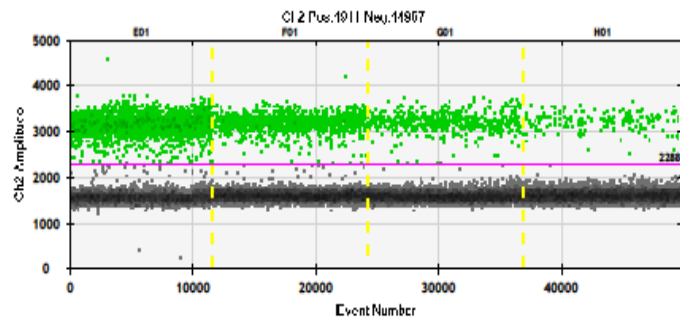
Bakterien direkt in die Droplets verpacken?



→ Bakterien haben mehr als genug Platz

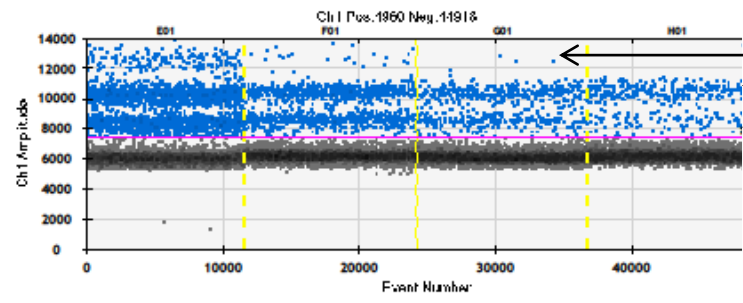
Charakterisierung direkt mit dPCR?

Linkage Assay: 3 Pathogenitätsfaktoren im gleichen Bakterium ?

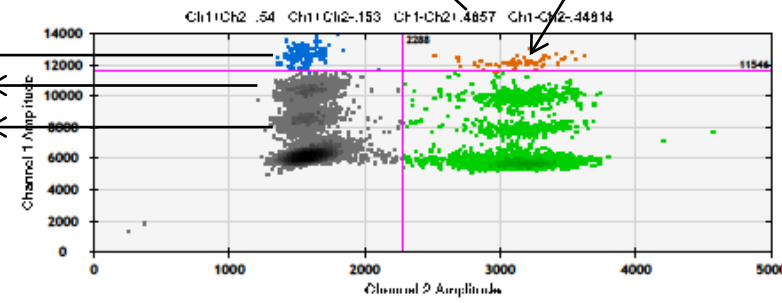


eae (JOE)

stx1 (FAM) und stx2 (FAM)



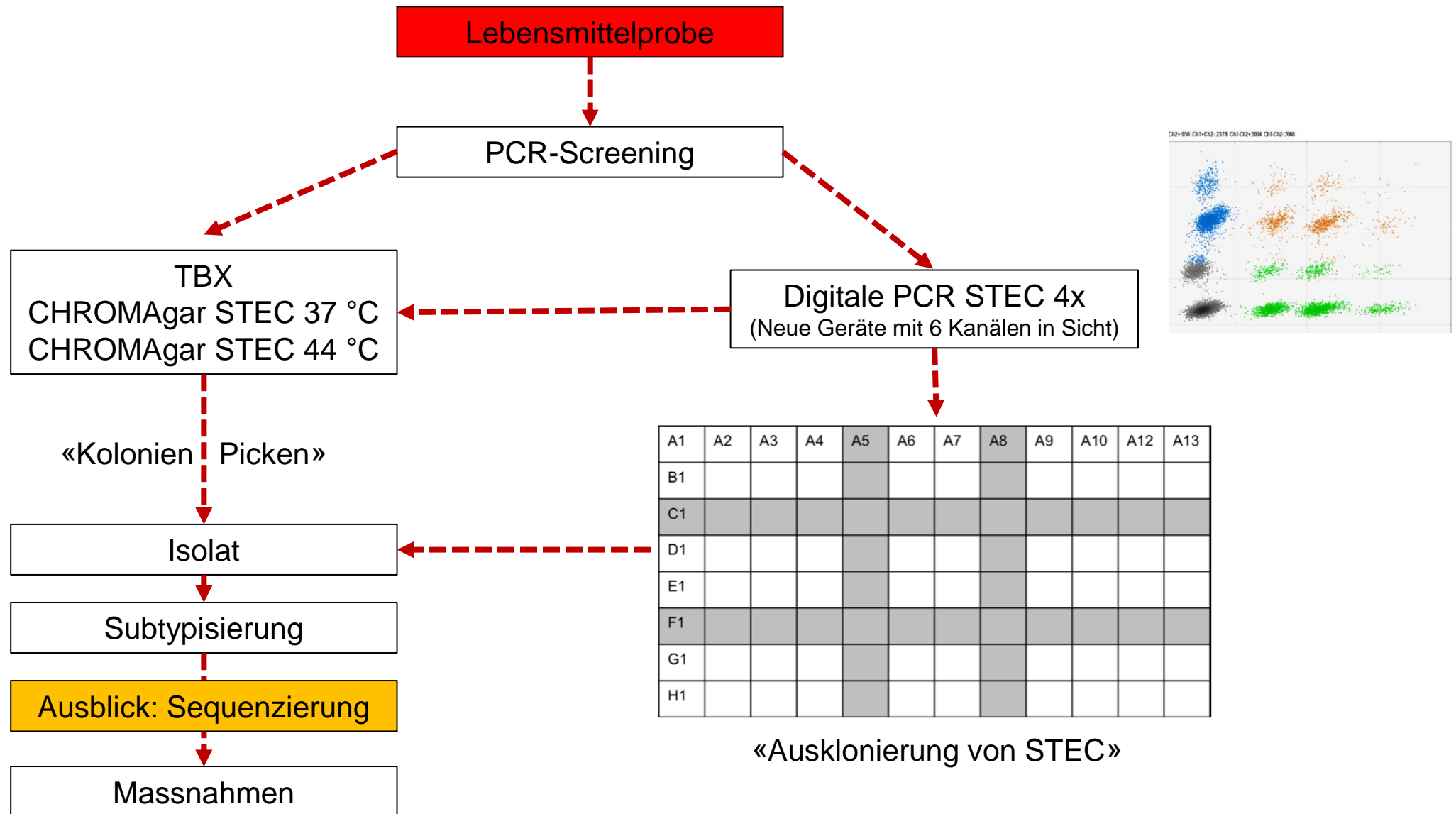
stx1, stx2 und eae positiv



Weitere Systeme

O157-eae	O157-stx1	O157-stx2
O145-eae	O145-stx1	O145-stx2
O111-eae	O111-stx1	O111-stx2
O104-eae	O104-stx1	O104-stx2
O103-eae	O103-stx1	O103-stx2
O26-eae	O26-stx1	O26-stx2

Zusammenfassung und Ausblick





Kanton Zürich

Kantonales Labor Zürich

18

**Danke fürs
Zuhören!**

Herzlichen Dank an

Dr. René Köppel und Patricia Haug

Kontakt

martin.peier@kl.zh.ch