

Protokoll zur Anreicherung und Isolierung von STEC/EHEC aus pflanzlichen Lebensmitteln¹

Stand: 20.06.2011

Tag 1

1. 25 g Probe mit 225 ml BRILA Bouillon² homogenisieren oder stomachern.
2. 6 h schüttelnd bei 37°C inkubieren³
3. Ausplattieren jeweils 0,1ml unverdünnt (1:1), 1:10 und 1:100 auf TBX-Agar und auf CHROMagar STEC. (für O104:H4 zusätzlich ESBL Brilliance, nur Platte mit unverdünnter Kultur anlegen.) Die TBX Platte mit unverdünnter Kultur doppelt anlegen, eine ist zum Ablesen und Keimisolierung, die andere ist für die Abschlämmung zur DNA Gewinnung für die PCR.
4. Platten bei 44°C⁴ 22-24h inkubieren.

Tag 2

1. Platten ablesen: TBX-Agar = blaue Kolonien E. coli außer NSF O157:H7, CHROMagar STEC: violette Kolonien = sind wichtigste EHEC O26, (O103 nicht alle) O111, O145, O157 und O104:H4, für EHEC O104:H4 auch ESBL Brilliance (nur tiefviolette Kolonien sind verdächtig).
2. Abschlämmen von TBX Platte (1:1) mit 1ml Wasser PCR Qualität. Isolierung von DNA (aus 1:10 Verdünnung der Abschlämmung) Rest der Abschlämmung aufbewahren, für längere Zeit einfrieren
3. RT-PCR mit DNA aus Abschlämmung (es geht auch klassische PCR mit Primer KS7+8, LP43+44) bitte nicht MK1 und MK2 nehmen (Hintergrund)
PCR Targets: stx1, stx2, O104wzx. (optional eae, ehlyA, aggR)
4. Bei positivem PCR Befund: violette Kolonien bzw. blaue Kolonien prüfen auf STEC und O104 Merkmale
5. Optional für EHEC O104:H4 Einsatz von CHROMagar STEC + Cephalosporin Hochselektiv)

¹ Für frische pflanzliche Lebensmittel, nicht für Trockenfrüchte und Saatgut getestet

² Wir verwenden nicht mTSB N da gestresste Bakterien in diesem Medium absterben können. BRILA hat sich gegenüber BPW als geeigneter zur Anreicherung von E. coli aus pflanzlichen Lebensmitteln erwiesen.

³ Da pflanzliche Lebensmittel schon eine Grundbelastung von ca 10⁷ Bakterien haben, bringt eine längere Anreicherungszeit keine Vorteile hinsichtlich einer höheren E. coli Keimzahl.

⁴ 44°C hat eine bessere Selektionswirkung gegen die typische bakterielle Pflanzenflora.

Abb. 1

Anreicherung einer positiven Sprossenprobe auf CHROMagar STEC (links) + CHROMagar STEC + Cephalosporin 3 Generation (rechts). Violette Kolonien sind EHEC O104:H4, der Antibiotikazusatz unterdrückt die pflanzliche Begleitflora (blaue Kolonien).

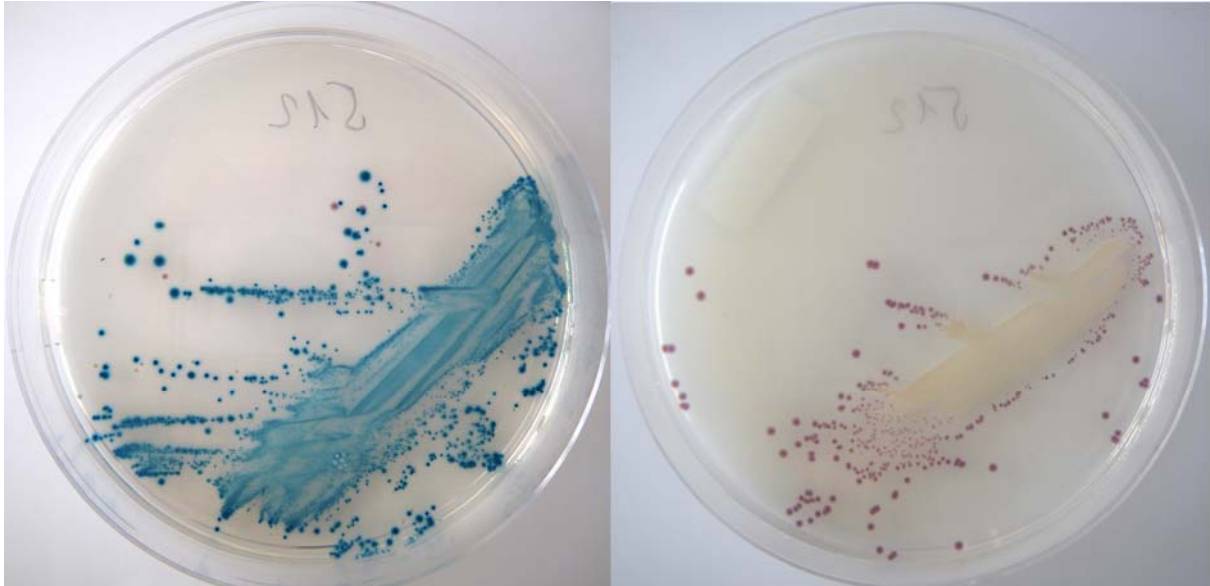


Abb. 2 ESCBL Brilliance

ESBL Brilliance typisches violettes Wachstum von EHEC O104 beide Kolonien unten. Die andersfarbigen Kolonien sind keine EHEC O104 und keine E. coli, sondern „Kontaminanten“ aus der Pflanzen- und Umgebungsflora.



Bei Rückfragen stehen die Kollegen aus dem NRL E. coli zur Verfügung:

Dr. L. Beutin (03 08412 2259),
lothar.beutin@bfr.bund.de

Frau Dr. Miko (030 8412 2201)
angelika.miko@bfr.bund.de

Verfasser:
NRL E. coli (BfR)
PD Dr. Lothar Beutin