

Unterscheidung von *Escherichia coli* O-Antigenen mittels Infrarotspektroskopie

Mauder N.

Norman.Mauder@cvuas.bwl.de
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt, Schaflandstraße 3, 70736 Fellbach

EINLEITUNG

In der amtlichen Lebensmittelüberwachung ist die Untersuchung auf verotoxinbildende *E. coli* (VTEC) ein wichtiger Untersuchungsparameter. VTEC-Isolate werden zur Bestätigung an das nationale Referenzlabor am Bundesinstitut für Risikobewertung versandt. Hier können durch spezielle und z.T. aufwändige Methoden Typisierungen durchgeführt werden, die eine Aufklärung von Infektionsketten unterstützen können. Bei größeren Ausbruchsgeschehen, mit massenhaftem Probenaufkommen (z.B. EAHEC O104:H4 im Jahre 2011), kann eine entsprechend effiziente Vorfilterung der erhaltenen Isolate durch ein Screening-Verfahren nützliche Dienste leisten.

Die Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) ist eine in der Anwendung schnelle und kostengünstige Technologie, die seit Jahren erfolgreich bei der Identifikation und Differenzierung von grampositiven [1] wie gramnegativen [2] Mikroorganismen aus Lebensmitteln und veterinärmedizinischen Proben eingesetzt wird.

Auch O-Antigene lassen sich durch die FTIR unterscheiden. Dies wurde beispielsweise für *Listeria*, *Yersinia*, *Salmonella*, sowie für *Escherichia*, allerdings nur an wenigen Serovaren, gezeigt [3].

Beispiel *E. coli* O104:H4

Vier Patientenisolat des Ausbruchs von 2011 konnten zusammen mit anderen O104-Isolaten mittels FTIR mit einer Sensitivität von 100% (43/43) von Isolat mit anderen O-Antigenen unterschieden werden (siehe Abb.1).

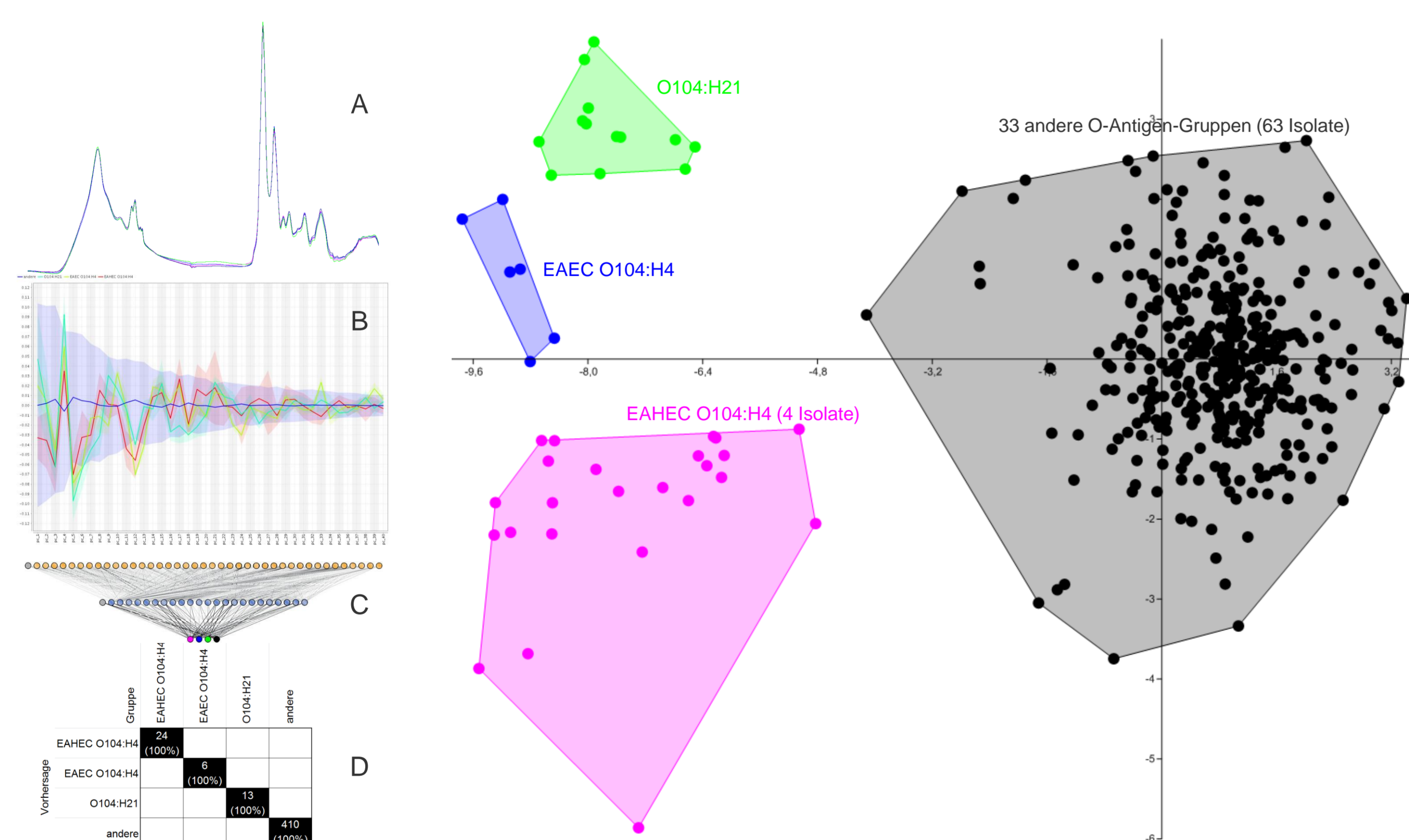
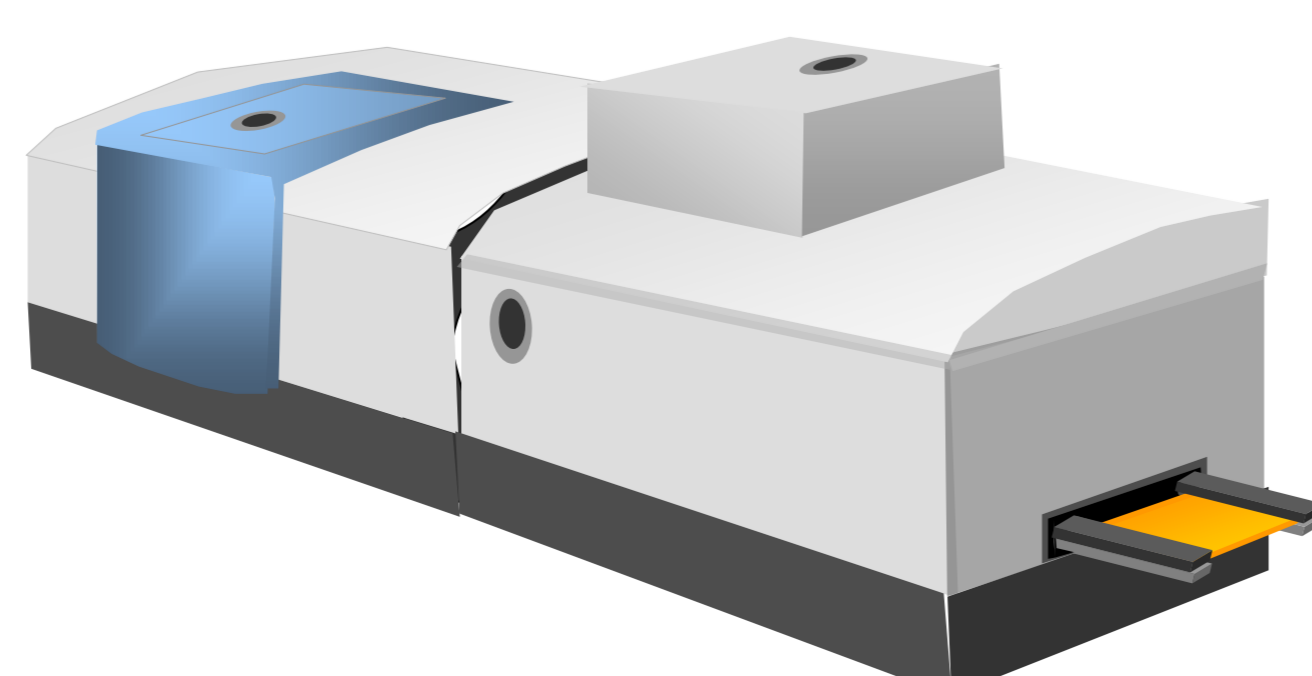


Abb. 1: Ermittlung der Unterscheidbarkeit von Isolaten oder Isolatgruppen mittels FT-IR.
Links: Prozedere
Nach Datenvorbehandlung der Infrarot-Absorptionsspektren (A) (2. Ableitung > Wellenzahlfenster: 600-1400 cm⁻¹ > Vektornormalisierung > Hauptkomponentenanalyse (Deviationplot, B)) werden mehrere (hier n=3) Kreuzvalidierungen mit X=2 (stratifizierte 50:50 Teilung des Datensatzes für Training und Validierung) und künstlichen neuronalen Netzen (C) als Klassifikatoren durchgeführt und in einer Konfusionsmatrix (D) dargestellt.
Rechts: kanonische Varianzanalyse mit 453 FTIR-Spektren von 4 Gruppen (je 1-33 Isolate, je 5+ Spektren pro Isolat).



Differenzierung der O-Antigene mittels FTIR

Die gleichzeitige Differenzierung von 34 verschiedenen O-Antigenen gelingt bei Verwendung von künstlichen neuronalen Netzen als Klassifikator mit einer durchschnittlichen Sensitivität von 97% (siehe Abb. 2).

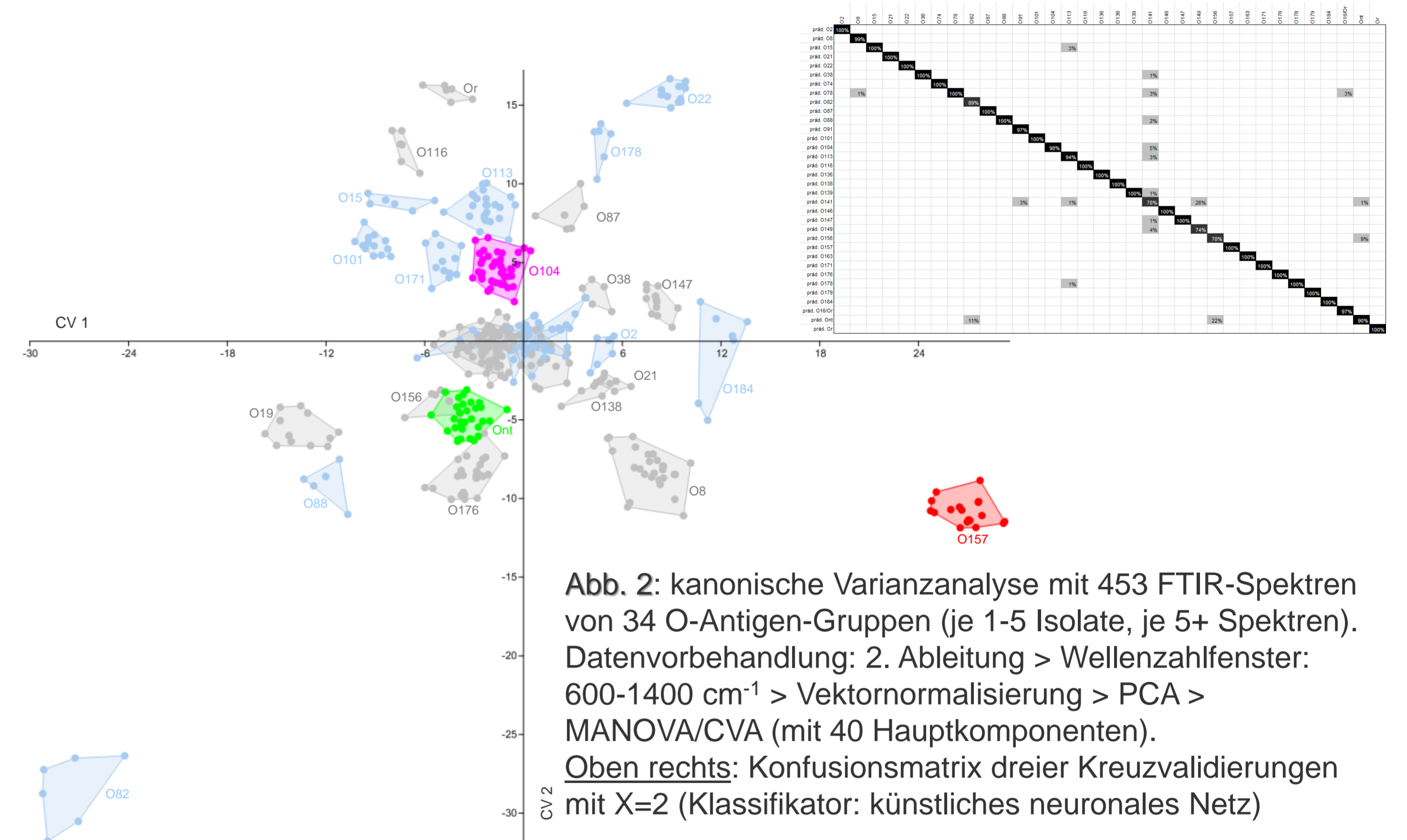


Abb. 2: kanonische Varianzanalyse mit 453 FTIR-Spektren von 34 O-Antigen-Gruppen (je 1-5 Isolate, je 5+ Spektren). Datenvorbehandlung: 2. Ableitung > Wellenzahlfenster: 600-1400 cm⁻¹ > Vektornormalisierung > PCA > MANOVA/CVA (mit 40 Hauptkomponenten).
Oben rechts: Konfusionsmatrix dreier Kreuzvalidierungen mit X=2 (Klassifikator: künstliches neuronales Netz)

Lediglich die Gruppe der heterogenen nicht-typisierbaren (Ont) Isolate lässt sich bisher nicht von O157 und O81 abgrenzen. Ebenfalls gibt es Verwechslungen bei den Serogruppen O141 und O149.

Versucht man alle verwendeten Isolate (n=69) - ungeachtet ihrer O-Antigene - voneinander zu unterscheiden, so gelingt dies mit einer durchschnittlichen Sensitivität von 89%. In der Konfusionsmatrix können gegenseitige Verwechslungen leicht erkannt werden. Hier ist es sinnvoll die verwechselten Isolate zu Gruppen zu vereinigen und die Differenzierung zu wiederholen. Durch dieses Prozedere entstanden schließlich 55 Gruppen, die zweifelsfrei erkannt werden (s. Tab. 1).

Tab. 1: Unterscheidung von 69 *E. coli* Isolaten (je 5+ Spektren) via FTIR.
Nicht sicher unterscheidbare Isolate wurden zu 55 Gruppen zusammengefasst, die mit einer durchschnittlichen Sensitivität von 100% zu unterscheiden sind.
Gruppen sind durch alternierenden Hintergrund getrennt.
Serotypisch heterogene Gruppen sind gelb hinterlegt.

Isolat	Serovar	Isolat	Serovar	Isolat	Serovar
CVUAS1654	O2:H42	CVUAS2054	O141:K85ab	CVUAS2266	O8:K87
CVUAS1680	O8:H7	CVUAS2040	O141:K85ac	CVUAS7124	O104:H21
CVUAS1502	O8:H9	CVUAS2042	O141:K85ac	CVUAS1548	O22:H16
CVUAS4025	O8:H19	CVUAS0909	O146:H21	CVUAS7654	O22:H8
CVUAS7658	O21:H21	CVUAS1721	O146:H21	CVUAS1364	O91:H+
CVUAS1363	O38:H26	CVUAS4899	O146:H28	CVUAS1532	O91:H21
CVUAS7533	O141:K29	CVUAS1990	O147:K89	CVUAS2265	O101:K32
CVUAS1746	O78:K80	CVUAS5541	O147:K89	CVUAS6609	O163:H19
CVUAS5553	O78:K80:K99	CVUAS2567	O149:K91	CVUAS8120	O104:H4
CVUAS2491	O78:K87	CVUAS7555	O15:H16	CVUAS8121	O104:H4
CVUAS1544	O82:H8	CVUAS4860	O157:H7	CVUAS8171	O104:H4
CVUAS7924	O87:H16	CVUAS2485	O157:K-	CVUAS8172	O104:H4
CVUAS5841	O88:H25	CVUAS9903	O157:K-	CVUAS0907	O113:H4
CVUAS5554	O101:K30	CVUAS5058	O163:H+	CVUAS1545	O113:H21
CVUAS4335	O104:H4	CVUAS8343	O171:H25	CVUAS2541	O141:K85ab
CVUAS6248	O113:H21	CVUAS9852	O178:H19	CVUAS2552	O141:K85ab
CVUAS7652	O113:H4	CVUAS8325	O179:H8	CVUAS5529	O145:K91
CVUAS6326	O116:H28	CVUAS4821	O184:H2	CVUAS1547	Ont:H4
CVUAS2960	O136:H16	CVUAS1534	Ont:H18	CVUAS4218	O156:H4
CVUAS2695	O138:K81	CVUAS2784	Ont:H28	CVUAS0846	O176:H4
CVUAS1753	O139:K32	CVUAS1546	Ont:H38	CVUAS2647	O176:H4
CVUAS7635	O141:H2	CVUAS0151	Or(O16)	CVUAS0853	O176:H4
CVUAS5536	O141:K85	CVUAS7655	Or:H21	CVUAS0908	O176:H4

Fazit

Die FTIR kann für *E. coli* als schnelle Screening-Methode für eine Vielzahl von Serovaren verwendet werden. Die Methodik lässt sich fallbezogen auch zum direkten Vergleich von Isolaten einsetzen.

Diese Studie wurde freundlicherweise unterstützt vom Ministerium für Ländlichen Raum und Verbraucherschutz Baden-Württemberg (Kap. 0827 / Tit. 427 51).

LITERATUR

- [1] Rau *et al.*; Berl Münch Tierärztl Wochenschr 2009; **122**: 25-36
- [2] Kuhm *et al.*; Appl Environ Microbiol 2009; **75**: 5809-5813
- [3] Helm *et al.*; J Gen Microbiol 1991; **137**: 69-79

